



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Estandarización e implementación de un método analítico para determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Armando ESPINOZA BARRETO

Julio Cesar TORIBIO ROMERO

ASESOR

César Augusto CANALES MARTÍNEZ

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Espinoza A, Toribio J. Estandarización e implementación de un método analítico para determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2017.

1144



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

“ESTANDARIZACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO HIPÚRICO EN ORINA POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA VISIBLE”

Que presentan los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:


**ARMANDO ESPINOZA BARRETO Y
 JULIO CESAR TORIBIO ROMERO**


Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

Dieciséis (16) Muy Bueno

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 04 de setiembre de 2017.


 Mg. Norma Angélica Carlos Casas
 Presidente


 Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz
 Miembro


 Q.F. Luz Kathia Hernández Calderón
 Miembro


 Q.F. Gustavo Antonio Guerra Brizuela
 Miembro

“FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO”

A Dios, por enseñarme día a día a creer en él y que con él todo se puede conseguir.

A mis padres Clara Doris y Armando, por hacer que progrese día a día.

A mis hermanos, por su apoyo en cada momento de mi vida.

A mi pareja por su apoyo y comprensión, por motivarme todos los días a cumplir nuestras metas que poco a poco lograremos conseguir juntos con mucho amor.

Al Doctor Eriberto Carrasco Raymunde, por enseñarme lo que es una amistad sincera y apoyarme siempre con sus buenos consejos.

Armando

A mis padres Liliana y Julio por su constante apoyo y amor hacia mi persona en toda mi vida.

Me dieron la vida y han estado siempre conmigo en todo momento, gracias por darme una carrera. Los quiero mucho y este trabajo es por ustedes.

A mi hermano Juan Manuel por apoyarme y acompañarme en cada momento de mi vida.

Julio

AGRADECIMIENTOS

A la memoria de nuestra querida maestra, Bertha Jurado Teixeira que estamos seguros que nos sigue guiando por las sendas del estudio y la investigación, con la ternura de siempre desde la eternidad.

Agradecemos a nuestro asesor Mg. César Augusto Canales Martínez, por alentarnos y por brindarnos su asesoría para el desarrollo del presente trabajo.

Agradecemos por el apoyo constante en nuestra etapa de pregrado y desarrollo nuestro a la Dra. Arilmi Gorriti Gutiérrez

Agradecemos a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por facilitarnos el conocimiento que gracias a sus catedráticos lo hemos adquirido y por ser parte de una grandiosa institución

A los señores miembros del jurado calificador y examinador:

Mg. Norma Carlos Casas

Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz

Q.F. Gustavo Guerra Brizuela

Q.F. Luz Kathia Hernández Calderón

Armando y Julio

ÍNDICE

Listado de abreviaturas.....	1
Listado de tablas.....	2
Listado de figuras.....	4
Listado de anexos.....	5
Resumen.....	6
Summary.....	7
Introducción.....	8
Hipótesis.....	9
Objetivos.....	10
I. Generalidades.....	11
1.1. Antecedentes.....	11
1.2. Tolueno.....	14
1.2.1. Descripción.....	14
1.2.2. Usos.....	15
1.2.3. Fuente de exposición.....	16
1.2.4. Toxicocinética del tolueno.....	17
1.2.4.1. Absorción.....	17
1.2.4.2. Distribución.....	18
1.2.4.3. Transformación y metabolismo.....	19
1.2.4.4. Excreción.....	21
1.2.5. Toxicodinamia del tolueno.....	23
1.2.6. Intoxicación por tolueno.....	25
1.2.6.1. Intoxicación aguda.....	25
1.2.6.2. Intoxicación crónica.....	26

1.2.7. Tratamiento.....	27
1.3. Estandarización.....	28
1.3.1. Parámetros de estandarización.....	29
1.3.1.1 Precisión.....	29
1.3.1.2. Repetibilidad.....	29
1.3.1.3. Reproducibilidad.....	29
1.3.1.4. Exactitud.....	30
1.3.1.5. Linealidad.....	31
1.3.1.6. Límite de detección.....	34
1.3.1.7. Límite de cuantificación.....	35
1.3.1.8. Rango de aplicación.....	35
1.3.1.9. Especificidad.....	36
1.4. Implementación.....	36
II. Parte experimental.....	37
2.1. Muestra de estudio.....	37
2.2. Materiales, equipos y reactivos.....	37
2.2.1. Materiales.....	37
2.2.2. Equipos.....	37
2.2.3. Reactivos.....	38
2.3. Parámetros de inclusión.....	38
2.4. Parámetros de exclusión.....	38
2.5. Diseño experimental.....	39
2.5.1. Método analítico para determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible.....	39
2.5.1.1. Método.....	39
2.5.1.2. Rango de medición.....	39

2.5.1.3. Fundamento de la reacción.....	39
2.5.1.4. Muestras con valor de ácido hipúrico conocido.....	40
2.5.1.5. Estándares.....	40
2.6. Procedimiento de la Implementación del método de determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible.....	41
2.6.1. Elaboración de la curva de calibración.....	41
2.6.2. Determinación de la longitud de onda óptima.....	47
III. Resultados.....	48
IV. Discusión.....	59
V. Conclusiones.....	60
VI. Recomendaciones.....	61
VII. Referencias bibliográficas.....	62
VII. Anexos.....	68

LISTADO DE ABREVIATURAS

MEOS: Sistema oxidante de etanol microsomal

ADH: alcohol deshidrogenasa

AIDH: aldehído deshidrogenasa

NAD: cofactor nicotinamida adenina dinucleótido.

BSC: cloruro de sulfonilbenceno

MNDA: N-metil-D-aspartato

GABA: ácido γ -aminobutírico

5-HT₃: 5-hidroxitriptamina

IARC: International Agency for Research on Cancer

HPLC: high performance liquid chromatography

CYP: Citocromo P450

ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists

NIOSH: Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional

INSHT: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Efecto del tolueno sobre los receptores postsinápticos	23
Tabla 2. Preparación de estándares para la realización de la curva de calibración del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	42
Tabla 3. Preparación de las muestras para la cuantificación de ácido hipúrico por el método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	43
Tabla 4. Ensayos propuestos para determinar la especificidad del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	45
Tabla 5. Rango de aplicación obtenido del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	48
Tabla 6. Absorbancias obtenidas del proceso de estandarización del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	49
Tabla 7. Estadística de las absorbancias obtenidas del analista 1 durante la implementación del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	50
Tabla 8. Estadística de las absorbancias obtenidas del analista 2 durante la implementación del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	51
Tabla 9. Estadística de las absorbancias obtenidas del analista 3 durante la implementación del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	52
Tabla 10. Precisión de los analistas 1, 2 y 3 durante la implementación del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	53
Tabla 11. Exactitud del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible por ensayo de recuperación	53

Tabla 12. Precisión intermedia (reproducibilidad) del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible por ensayo de recuperación	54
Tabla 13. Parámetros de estandarización en función del coeficiente de variación (CV)	55
Tabla 14. Parámetros del proceso de estandarización del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	56
Tabla 15. Resumen de parámetros del método estandarización e implementación de un método analítico para determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	56
Tabla 16. Aceptación de la hipótesis nula (H_0) y rechazo de la hipótesis alternativa (H_1) del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	56
Tabla 17. Especificidad del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	58

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del tolueno	15
Figura 2. Ruta de decodificación del tolueno	20
Figura 3. Mecanismo de acción del tolueno sobre diferentes receptores	24
Figura 4. Comportamiento no lineal	32
Figura 5. Comportamiento lineal	32
Figura 6. Reacción de ácido hipúrico y cloruro de sulfonilbenceno	40
Figura 7. Reacción entre el etanol y cloruro de sulfonilbenceno	40
Figura 8. Procedimiento para la cuantificación de ácido hipúrico por el método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	46
Figura 9. Rango de aplicación obtenido del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	49
Figura 10. Ecuaciones de recta Concentración vs Absorbancia obtenidos por triplicado del Analista 1 durante la implementación del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	50
Figura 11. Ecuaciones de recta Concentración vs Absorbancia obtenidos por triplicado del Analista 2 durante la implementación del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	51
Figura 12. Ecuaciones de recta Concentración vs Absorbancia obtenidos por triplicado del Analista 3 durante la implementación del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	52
Figura 13. Curva de calibración del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible	55

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Análisis de regresión: absorbancia vs ácido hipúrico (g/L)	68
Anexo 2. Análisis estadístico de la precisión entre analistas	69
Anexo 3. Análisis estadístico de la determinación de ácido hipúrico en muestras de orina ejecutado por tres analistas	70
Anexo 4. Resultados de absorbancias de muestras de orina.	71
Anexo 5. Certificado de análisis del ácido hipúrico	72
Anexo 6. Certificado de análisis de piridina (página 1)	73
Anexo 7. Certificado de análisis de piridina (página 2)	74
Anexo 8. Certificado de análisis de cloruro de sulfonilbenceno	75

RESUMEN

En el Perú la mayoría de laboratorios no cuentan con equipos sofisticados como HPLC para determinar el grado de intoxicación por exposición al tolueno de trabajadores de muchas empresas, es por ello que se realizó una estandarización e implementación de un método analítico para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible, con materiales y equipos más accesibles y menos costosos en comparación a un HPLC, que pueda determinar cuantitativamente la contaminación en orina de ácido hipúrico (metabolito de tolueno) como indicador de contaminación.

Las muestras se prepararon a partir de orinas de niños comprendidos entre 5 y 7 años de edad (libres de ácido hipúrico), las cuales fueron contaminadas intencionalmente en diferentes concentraciones conocidas de ácido hipúrico, se analizaron con el método propuesto en la presente tesis, las cuales fueron leídas mediante espectrofotometría ultravioleta visible, considerando los parámetros de estandarización como: precisión, repetibilidad, exactitud, linealidad, reproducibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango de aplicación, especificidad, dando como resultado una curva de calibración con coeficiente de determinación de 0,9989 y como coeficiente de variación 1,27 %, indicando así una estandarización satisfactoria.

Palabras clave: tolueno, ácido hipúrico estandarización, linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión, especificidad.

SUMMARY

In Peru, most laboratories do not have sophisticated equipment such as HPLC to determine the degree of intoxication by toluene exposure of workers in many companies, so a standardization and the implementation of an analytical method for acid determination Hippuric In urine by visible ultraviolet spectrophotometry, with more accessible and less expensive materials and equipment compared to an HPLC, which can quantitatively determine urine contamination of hypothalamic acid (toluene metabolite) as an indicator of contamination.

The samples were prepared from children between 5 and 7 years of age (free of hippuric acid), which were intentionally contaminated in different known concentrations of hippuric acid, were analyzed with the method proposed in the present thesis, the accuracy , repeatability, accuracy, linearity, reproducibility, limit of detection, limit of quantification, range of application, specificity, resulting in a calibration curve with coefficient of determination of 0.9989 and as coefficient of variation 1.27 %, thus indicating Satisfactory standardization.

Key words: toluene, hippuric acid, standardization, linearity, accuracy, respectability, precision, specificity.

INTRODUCCIÓN

El tolueno es un hidrocarburo aromático muy utilizado como disolvente de sustancias en la industria de pinturas grasas, ceras, lacas, caucho y también muy usado en tintas de imprenta. Su acción tóxica sobre el organismo está en función de sus propiedades químicas, y en algunas áreas de trabajo son la principal fuente de riesgo de salud para los trabajadores.¹

Debido al incremento de su uso, aquellos que manipulan esta sustancia están expuestos a una contaminación que puede afectar su salud y con el tiempo afectar su sistema nervioso central²; es por ello que los laboratorios se ven obligados a contar con métodos más sencillos, que no le impliquen tiempos prolongados de análisis ni equipos costosos; por este motivo se presenta en este trabajo una estandarización e implementación de un método analítico para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible que cumple con los parámetros de estandarización de un método analítico garantizando la confiabilidad de los resultados y del método propuesto.

HIPÓTESIS

El método analítico para determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible permite determinar la concentración de ácido hipúrico con un alto grado de confiabilidad conforme a los parámetros de estandarización.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estandarizar e implementar un método analítico para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible a partir de parámetros estandarizados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar experimentalmente los parámetros de estandarización del método de determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible: precisión, repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango de aplicación, especificidad en función al coeficiente de variación.
2. Implementar el método propuesto de determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible.

I. GENERALIDADES

1.1. ANTECEDENTES

En 1963, Charles J. Umberger y Frank F. Fiorese introdujeron un método colorimétrico para detectar ácido hipúrico basado en la reacción colorimétrica de éste ácido disuelto en piridina y bencenosulfonilcloruro (BSC). Para la aplicación de su método y determinación de ácido hipúrico en orina, este debe ser extraído de la orina mediante una extensiva purificación, además de que el ácido salicílico y otros aminoácidos pueden causar interferencia con éste método. El ácido hipúrico produce una coloración que varía desde anaranjado hasta rojo, esta coloración es determinada por la concentración. La detección del color se obtiene desde 0,3 µg de ácido hipúrico en 0,5 mL de la mezcla de reacción. La curva de absorción máxima para la solución roja disuelta en cloroformo se presenta a 420 nm a los tres minutos, pero disminuye gradualmente virando de rojo a naranja con una absorbancia máxima de 380 nm a los 20 minutos.³

En 1967, Kehl describió un método para la determinación de ácido hipúrico en orina, basándose en la formación de un derivado de bromina, el cual es poco sensible.⁴

En 1972, Katsumano Tomokuni y Masana Ogata encontraron que el ácido hipúrico disuelto en una solución de agua y piridina en proporción 1:1 produce un color rojo anaranjado cuando se le adiciona BSC a temperatura ambiente (estándar de oro).

La absorción espectral del color muestra sólo una máxima de 410 nm y es totalmente diferente al color dado por el método de Umberger y Fiorese. Con esta reacción colorimétrica, ellos pudieron desarrollar un método directo y sensible de determinación de ácido hipúrico en orina, que sigue la ley de Lambert-Beer. La reacción colorimétrica desarrollada por Ogata para detección y estimación de niveles de concentración de ácido hipúrico tiene gran confiabilidad y sensibilidad ya que se encuentra registrado con el número 8 300 en el manual de métodos analíticos del Instituto Nacional para la Salud y Seguridad Ocupacional.^{5, 6,7}

Astudillo realizó la curva de calibración de ácido hipúrico sobre los rangos de 15 µg a 150 µg/mL para estandarizar el espectrofotómetro utilizado. Utilizó valores fijos de 10 concentraciones a 572 nm de longitud de onda y tomó las absorbancias de estas concentraciones. Preparó la solución madre disolviendo 0,1 g de ácido hipúrico en 100 mL de agua destilada, a su vez determinó que su método es mejor al de Ogata ya que la reacción colorimétrica no reacciona con ninguno de los componentes normales de la orina (urea, creatinina, glicina, ácido úrico) como sí lo hace el método de Ogata por utilizar una longitud de onda de 422 nm, sin embargo el método de Astudillo utiliza una absorbancia de 572 nm de longitud de onda donde ningún otro compuesto de la orina es detectado. El método propuesto por Astudillo puede realizarse directamente en orina, sin necesidad de realizar la extracción (como se realiza en el método de Ogata), además se puede aplicar en otros líquidos corporales como por ejemplo: en suero y líquido cefalorraquídeo.⁸

El método "Determinación de ácido fenilgloxílico, ácido mandélico, ácido hipúrico y ácidos metilhipúricos en orina - método de cromatografía líquida en fase reversa con detector de ultravioleta" es un método aceptado por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT) que ha sido sometido a un protocolo de estandarización por organizaciones oficiales competentes en el área de la normalización de métodos analíticos, o bien ha sido adoptado como método recomendado por asociaciones profesiones dedicadas al estudio y evaluación de riesgos por agentes químicos, así como aquellos métodos recomendados por la Unión Europea o basados en métodos ampliamente conocidos y evaluados por especialistas en este tipo de análisis.⁹

Según R. J. Flanagan y col. Para la determinar ácido hipúrico en orina propone : ajustar el pH de 1 mL de muestra o patrón a pH 2 con ácido clorhídrico diluido y agregar cloruro de sodio hasta que la solución esté saturada. Agregar 2 mL de dietileter: metanol (9:1), mezclar en vortex durante 1 minuto y centrifugar durante 5 minutos. Aspirar la capa superior de éter y colocarla en un tubo limpio, re-extrar la fase acuosa con una porción de 2 mL de dietileter: metanol (9:1). Juntar los extractos etéreos y agregar 1 mL a aproximadamente 0,5 g de la silica colocada en un tubo limpio. Evaporar el solvente bajo una corriente de aire o nitrógeno y agregar 3 mL del reactivo de p-dimetilaminobenzaldehído, calentar sobre una plancha calefactora a 135 °C durante 5 minutos. Enfriar, agregar 4 mL de metanol, mezclar en vortex durante 1 minuto y centrifugar durante 5 minutos.

Separar los extractos metanólicos y colocarlos en un tubo limpio. Re-extraer la sílice con una nueva porción de 4 mL de metanol. Combinar los extractos metanólicos y medir la absorbancia a 460 nm contra el blanco de orina.

1.2. TOLUENO

1.2.1. DESCRIPCIÓN

Su nombre deriva del bálsamo del árbol *Myroxylon balsamum* (Bálsamo Tolú o bálsamo de Colombia) donde se encuentra formando resinas producto de su metabolismo. Henri Etienne Sainte-Claire Deville lo obtuvo por primera vez en 1844 mediante destilación seca.¹⁰

El tolueno es un hidrocarburo aromático que a condiciones normales de presión y temperatura es un líquido transparente, volátil e inflamable, la fuente principal es el petróleo crudo.¹¹

El tolueno es soluble en la mayoría de solventes orgánicos como el alcohol, benceno y éter pero muy poco soluble en agua.¹²

Debido a su volatilidad lo hace una sustancia peligrosa para la salud; además las temperaturas mayores a 5 °C representan elevado riesgo de inflamabilidad.¹³

Pertenece al grupo de los alquilbencenos, se diferencia del benceno por la presencia de un grupo metilo, esta diferencia estructural hace que el tolueno sea más liposoluble y menos volátil que el benceno.¹⁴

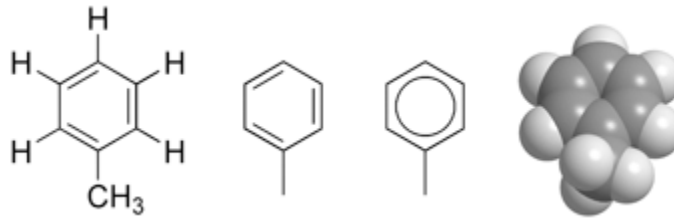


Figura 1. Estructura química del tolueno¹⁵

1.2.2. USOS

El tolueno es utilizado como solvente de aceites, resinas, alquitrán de hulla y asfalto, disolvente del caucho natural (mezclado con ciclohexano) y caucho sintético, se utiliza en la industria de las colas, neumáticos, ropas impermeables y calzado. Es usado como solvente y diluyente para pinturas, pegamentos, barnices de celulosa, tintas de fotograbado, pinturas, lacas, tintas e imprenta; también puede encontrarse en mezclas que se utilizan para productos de limpieza y como agentes de extracción de grasas en diversas industrias.¹³

El tolueno es una importante materia prima para la síntesis orgánica, especialmente en la producción de cloruros de benzoilo y bencilideno, p-toluensulfocloramida sódica (cloramina T); 2, 4, 6-trinitrotolueno (TNT), tolueno diisocianato, fenol, ácido benzoico, sacarina, caprolactama (molécula del *nylon*), perfumes, detergentes y colorantes. Asimismo, es un componente de combustibles y refrigerantes utilizados en aviación y automóviles, en la industria petrolera y petroquímica.¹⁵

1.2.3. FUENTES DE EXPOSICIÓN

Las fuentes de contaminación¹⁴ son los trabajos en donde se emplea el tolueno, tales como:

- Preparación, extracción, rectificación de tolueno.
- Empleo del tolueno como materia prima para obtener sus derivados.
- Extracción de materias grasas, desengrasado de huesos, pieles, cueros, fibras, textiles, tejidos; limpieza en seco; desengrasado de piezas metálicas.
- Preparación de disoluciones de caucho y de sus derivados; manipulación y empleo de estas disoluciones.
- Fabricación y aplicación de barnices, pinturas, esmaltes, masillas, tintas, pegamentos, productos de mantenimiento y limpieza que contengan tolueno.
- Empleo de tolueno como disolventes de resinas naturales o sintéticas.
- Empleo de tolueno como deshidratante de alcoholes y otras sustancias líquidas o sólidas.
- Empleo de tolueno como desnaturalizante.
- Preparación de carburantes conteniendo hidrocarburos bencénicos, transvase y manipulación de tales carburantes.

1.2.4. TOXICOCINÉTICA DEL TOLUENO

1.2.4.1. ABSORCIÓN

El tolueno ingresa al cuerpo humano, a través del aparato respiratorio, digestivo y en menor proporción a través de la piel, la principal absorción se produce por exposición a los vapores, en promedio aproximadamente 50 % es absorbido por vía respiratoria.^{1, 16}

- Absorción por exposición inhalatoria: a una exposición dada de tolueno la concentración en los alveolos y sangre arterial incrementa rápidamente durante los primeros 10 - 15 minutos, a los 10 segundos de exposición es posible detectar tolueno en sangre arterial. Después de eso la concentración aumenta lentamente y alcanza un nivel constante después de unos 25 minutos, durante este tiempo la retención es de 75 - 80 %, la tasa de retención disminuye tal cual el organismo se aproxima a un estado de equilibrio con respecto a la absorción, deposición y la excreción de tolueno y sus metabolitos. Después de 2 - 3 horas de exposición la tasa de retención cae a un nivel casi constante aproximadamente de 40 - 50 %. La tasa media de retención durante un período de 5 horas es aproximadamente de 50 %.¹⁶

- Absorción por exposición oral: experimentos en animales han demostrado que el tolueno se absorbe más lento por tracto gastrointestinal que por los pulmones. La concentración máxima en sangre alcanza a las 2 horas de su administración oral. Su absorción puede ocurrir en la boca, el estómago y el intestino delgado.

La absorción es casi el 100 % en el que el 76 % recurre a la forma de ácido hipúrico en la orina y el 18 % es excretado en forma de vapores de tolueno por los pulmones.^{16, 17}

Turkall et al. (1991) informaron que más del 99 % de una única dosis de tolueno radiomarcado se eliminó en ratas a través de la orina o aire expirado, indicando una absorción casi total de la dosis de exposición.¹⁸

- **Absorción por exposición dérmica:** el tolueno es absorbido lentamente a través de la piel. El rango de absorción del tolueno en humanos está entre 14 y 23 mg/cm²/hora.¹⁹

1.2.4.2. DISTRIBUCIÓN

Su elevada liposolubilidad condiciona su fijación en el tejido adiposo y el sistema nervioso, observándose una mayor concentración en el tejido adiposo, seguido por la médula ósea, glándulas suprarrenales, riñones, hígado, cerebro y sangre. Traspasa la membrana alveolar. La mezcla sangre/aire se mantiene en una proporción de 12 - 15,6 a 37 °C y entonces se distribuye por los diferentes tejidos en cantidades variables, que dependen de las características de perfusión y solubilidad respectivamente.^{14, 20, 21}

La proporción tejido/sangre es de 1 a 3, a excepción de aquellos tejidos ricos en grasas, que presentan un coeficiente de 80/100. El tolueno además puede atravesar la placenta y entrar en el feto, puede encontrarse también en la leche materna.

En los glóbulos rojos el tolueno aparece asociado con la hemoglobina, se cree que el tolueno interactúa con el núcleo hidrofóbico de la hemoproteína. La interacción del tolueno con los glóbulos rojos incrementa la cantidad de tolueno que puede ser transportado a las diferentes partes del cuerpo incluyendo el cerebro. El tolueno absorbido es distribuido a tejidos ricos en grasas y tejidos altamente vascularizados como el cerebro.^{13, 14, 22}

1.2.4.3. TRANSFORMACIÓN Y METABOLISMO

El 20 % del tolueno absorbido se excreta inmodificado por el aire espirado. La fracción retenida en el organismo (80 %) es metabolizada por la ruta del Sistema oxidante de etanol microsomal (MEOS), el cual requiere la enzima CYP2E1, parte de la familia de enzimas del citocromo P450 que hidroxila al tolueno en su cadena lateral a alcohol bencílico en casi al 90 %, posteriormente, las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH) y aldehído deshidrogenasa (AIDH) lo transforman en ácido benzoico que, por conjugación con la glicina, forma ácido hipúrico, que es el principal metabolito urinario debido a la excreción renal que suele producirse en los túbulos proximales.

La hidroxilación del anillo para formar ortocresol o paracresol representa menos del 5 % del total de metabolitos formados.²³

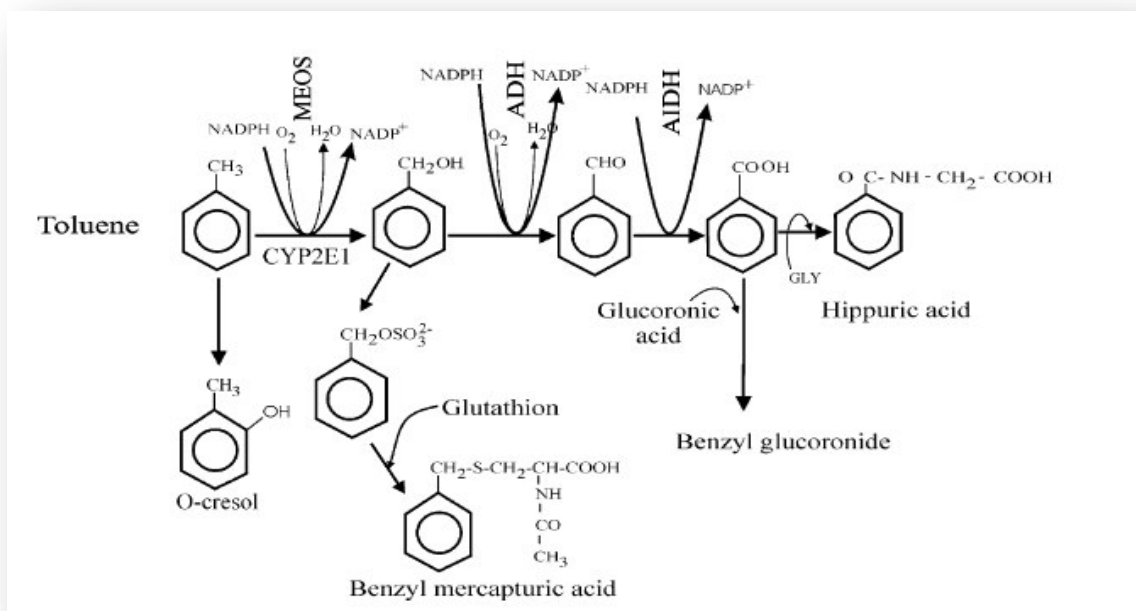


Figura 2. Ruta de detoxificación del tolueno²⁴

Según estudios in vitro el CYP2E1 es la más activa CYP isoenzima para formar el alcohol bencílico y el CYP1A2 es la más activa para formar ortocresol y paracresol.²⁵

Nakajima demostró que el CYP2E1, en bajas concentraciones de tolueno, contribuye con la formación de alcohol bencílico y paracresol; el CYP1A1/2 contribuye con la formación del ortocresol y paracresol; y el CYP2B1/2 y el CYP2C11/6 (en altas concentraciones de tolueno) contribuye con la formación de alcohol bencílico, ortocresol y paracresol. También demostró que el CYP2E1 es el más activo en la formación de alcohol bencílico, seguido por el CYP2B6, CYP2C8, CYP1A2 y CYP1A1.

Las actividades del CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A3, CYP3A4 y CYP3A5, son negativas en el metabolismo del tolueno. El CYP1A2 también estuvo activo durante la formación de ortocresol y paracresol (22 % y 35 % del total de metabolitos). El CYP2E1 y CYP2B6 catalizaron la formación de paracresol (11 – 12 % del total de metabolitos).²⁶

Como se mencionó anteriormente, se piensa que el alcohol bencílico es convertido en ácido benzoico por las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa, luego la formación del ácido hipúrico a partir del ácido benzoico es catalizada por las enzimas acilCoA sintetasa y acilCoA aminoácido N-aciltransferasa. La conjugación del ácido benzoico con el ácido glucurónico para formar benzoílo glucurónido es catalizado por la enzima UDP glucuronil transferasa. El hígado es el principal órgano donde ocurre el metabolismo del tolueno, y es sustentado por la alta concentración de CYP isoenzimas en comparación con otros órganos.²⁶

1.2.4.5. EXCRECIÓN

El tolueno absorbido a través de esta vía inhalatoria es excretado principalmente en la orina en forma de metabolitos y el tolueno no metabolizado es excretado en el aire exhalado. El tolueno menos metabolizado es el que se encuentra en el tejido adiposo. Según Nise el promedio de vida media del tolueno en el tejido adiposo es de 79 horas.^{1, 16, 27}

El ácido hipúrico se excreta por la orina con una vida media biológica de unas 3 horas.

Su eliminación es completa a las 18 horas tras finalizar la exposición. La vida media biológica del tolueno en la sangre y el aire alveolar es de unas 20 horas.^{13, 28}

Se han propuesto numerosas pruebas biológicas para valorar la exposición al tolueno: investigación del ácido hipúrico, ácido benzoico y o-cresol urinario; investigación del ácido hipúrico en la sangre; y del tolueno en la sangre y en el aire espirado.^{1, 21}

La determinación del contenido de ácido hipúrico en la orina constituye un buen indicador biológico de exposición, teniendo en cuenta que pueden existir variaciones individuales y que la orina de trabajadores no expuestos puede contener ácido hipúrico procedente de alimentos, en especial frutas y hortalizas; además de alimentos que contienen preservantes como benzoatos y ácido benzoico.^{13, 29}

Actualmente, se señala como Valor Límite de Exposición diaria al tolueno (VLA-ED) 50 ppm (192 mg/m³), y por lo tanto, el Valor Límite Biológico de Exposición al tolueno, con base en el metabolito bioindicador del ácido hipúrico es de 1,6 g/g Creatinina, valor que fue propuesto por la AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS en los Índices Biológicos de Exposición (Biological Exposure Indices, BEIs) del 2003.^{1, 4, 30}

1.2.5. TOXICODINAMIA DEL TOLUENO

Los órganos designados críticos del tolueno son los pertenecientes al sistema nervioso debido a su elevada acumulación en los tejidos ricos en lípidos, el tolueno ejerce acción a nivel de los receptores postsinápticos. Inhibe la estimulación producida por la actividad normal de los receptores NMDA y nicotínicos, y además potencia la actividad de los receptores GABA_A, glicina y 5-HT₃, por lo que potencia las funciones inhibitorias de los neurotransmisores que actúan en estos receptores.^{31, 32}

En la Tabla 1 y la Figura 3 se muestra de manera global, la interacción del tolueno con los principales receptores del sistema nervioso central y la manera en que actúa a nivel de los sistemas de neurotransmisión.^{31, 32}

Tabla 1. Efecto del tolueno sobre los receptores postsinápticos³²

NEUROTRANSMISOR	RECEPTOR	EFFECTO DEL TOLUENO SOBRE EL RECEPTOR
Glutamato	Receptor NMDA	↓ Inhibe (Antagonista)
Acetilcolina	Receptor nicotínico	↓ Inhibe (Antagonista)
Ácido Aminobutírico γ	Receptor GABA _A	↑ Activa (Agonista)
Glicina	Receptor Glicina	↑ Activa (Agonista)
Serotonina	Receptor 5-HT ₃	↑ Activa (Agonista)

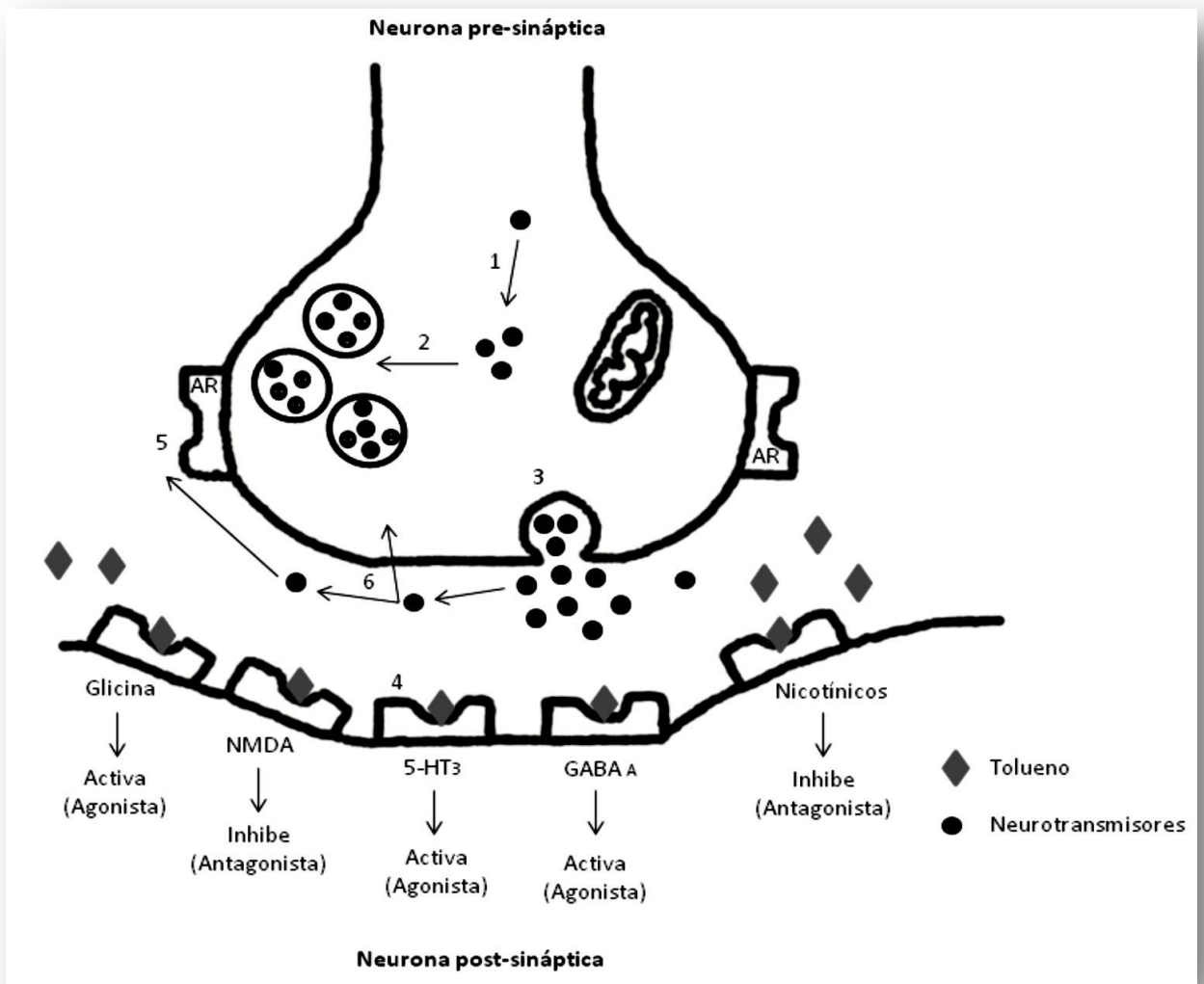


Figura 3. Mecanismo de acción del tolueno sobre diferentes receptores³²

1. Síntesis del neurotransmisor (NT) de glicina, glutamato, serotonina, GABA y acetilcolina. 2. Almacenamiento de vesículas. 3. Liberación del NT. 4. Receptores postsinápticos (donde el tolueno actúa como agonista o antagonista de los diferentes receptores). 5. Receptores presinápticos o autoreceptores (AR), que controlan la retroalimentación. 6. Recaptación del NT desde la hendidura sináptica.³²

Además el tolueno bloquea los canales de sodio voltaje dependientes del corazón humano y de una manera dependiente del uso y la frecuencia está involucrada en efectos como la aparición de arritmias cardíacas y otras cardiopatías.³³

1.2.6. INTOXICACIÓN POR TOLUENO

1.2.6.1. INTOXICACIÓN AGUDA

Los informes de la exposición oral de tolueno en los seres humanos se limitan a casos de ingestión accidental aguda. Un informe del caso de un hombre de 51 años que murió 30 minutos después de haber ingerido una gran cantidad de tolueno, la causa probable de la muerte fue grave depresión del sistema nervioso central.^{18, 34}

La toxicidad aguda se da por inhalación afectando el sistema nervioso central, el efecto puede ser depresivo o excitatorio, con euforia, alucinaciones seguidas de ataxia, confusión, mareos, somnolencia, trastornos del habla, visión borrosa, disminución de la agudeza visual, disminución de la discriminación visual, temblores, depresión respiratoria, convulsiones, coma y en casos graves, la muerte.^{35, 36}

La insuficiencia respiratoria aguda es una complicación rara de la exposición crónica al tolueno que puede ser letal si no se reconoce inmediatamente.³⁷

A menudo se ha ignorado la cardiotoxicidad del tolueno, especialmente en casos de abuso agudo lo cual produce arritmias y taquicardia ventricular.^{38, 39}

Nielsen et al. (1985) investigó los efectos renales producto de exposición aguda al tolueno en pintores y trabajadores que fueron expuestos a 382 mg/m³ de tolueno por 6,5 horas, concluyendo que no hay una relación causal entre la exposición aguda al tolueno y la excreción renal de albumina y una microglobunuria fue aparente durante la exposición de tolueno. Los resultados indican que en este estudio no hay una relación causal entre la exposición moderada al tolueno.^{40, 41}

1.2.6.2. INTOXICACIÓN CRÓNICA

La aspiración frecuente de vapores de tolueno a largo plazo provoca daños permanentes en el cerebro y disfunción a nivel del sistema nervioso central. Los efectos observados en los casos de abusos incluyen atrofia del cerebro, cerebelo y tronco encefálico, ataxia, descoordinación muscular, degeneración neuronal y desorden de personalidad.⁴²

La encefalopatía crónica asociada con el abuso prolongado del tolueno es particularmente importante porque parece ser un trastorno permanente e incapacitante relacionado con el daño de la materia blanca en el cerebro. Los estudios clínicos, neuropsicológicos y de resonancia magnética en toxicómanos han mostrado un daño relativamente específico a la sustancia blanca y un perfil consistente de deterioro neurológico y neuroconductual. Como resultado los seres humanos pueden desarrollar problemas con el lenguaje, la escucha, la visión, pérdida de la memoria y disminución en habilidad mental.^{2, 35}

Estudios indican que hay probabilidades significativas entre la discromatopsia adquirida y la exposición al tolueno.⁴³

Alteraciones hematológicas en porcentajes bajos son reportadas asociadas a la exposición a tolueno tales como macrocitosis, linfocitopenia, hipocromía, trombocitopenia a y leucopenia.⁴⁴

La IARC concluyó que no había pruebas suficientes en humanos para la carcinogenicidad de tolueno y como tal lo clasificó en el grupo 3 (No clasificable en cuanto a carcinogenicidad en seres humanos).⁴⁵

1.2.7. TRATAMIENTO

En caso de inhalación trasladar al paciente hasta donde haya aire limpio. Observar si hay dificultades respiratorias. Si se desarrolla tos o dificultad respiratoria, evaluar la irritación en el tracto respiratorio, bronquitis o neumonitis. Si es necesario administrar oxígeno y ventilación asistida. Tratar los broncoespasmos con inhalación de agonistas beta 2 y con corticoesteroides por vía oral o parenteral. No utilizar la adrenalina como broncodilatador ya que es arritmogénica y el tolueno puede producir arritmias.⁴⁶

En caso de exposición oral se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones: no provocar el vómito debido a la posibilidad de la aspiración del contenido gástrico. Cuando el paciente ha ingerido una gran cantidad de tolueno puede ser conveniente la aspiración del contenido gástrico con un tubo nasogástrico pequeño y flexible (debe protegerse las vías aéreas).

La toxicidad potencial de la cantidad ingerida debe ser sopesada contra el considerable riesgo de aspiración.²¹

El carbón (vegetal) activo puede inducir al vomito e incrementar el riesgo de aspiración. El carbón activo solo debería ser considerado después de una ingestión importante y reciente de tolueno. La intubación endotraqueal debería ser realizada primero en cualquier paciente con estado mental disminuido. Administrar una mezcla de carbón (vegetal) activo con agua (240 mL de agua/30g de carbón activo). (Dosis usual: 25 - 100 g en adultos/adolescentes, 25 - 50 g en niños de 1 a 12 años y 1 g/kg en niños menores de un año).²¹

En los pacientes que están inconscientes o con paro respiratorio se debe considerarla intubación orotraqueal o nasotraqueal para el control de las vías respiratorias.^{21, 46}

Tratamiento en caso de exposición por contacto con los ojos: Lavar los ojos con abundante agua al menos durante 15 minutos. Si en el paciente persiste la irritación, el dolor, la hinchazón, lagrimeo o fotofobia, este debe consultar inmediatamente a un oftalmólogo.⁴⁶

1.3. ESTANDARIZACIÓN

Estandarizar un método de análisis consiste en verificar y documentar con los siguientes parámetros: Precisión, repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango de aplicación, especificidad, que conlleve un alto grado de seguridad, a la obtención de

resultados precisos y exactos que permiten obtener información relevante y orientar el proceso de una estandarización propiamente dicha.⁴⁷

1.3.1. PARÁMETROS DE ESTANDARIZACIÓN

1.3.1.1. PRECISIÓN

Cuando realizamos una medida se deben obtener replicados, a partir de los cuales se puede observar el grado de concordancia que estos resultados tienen entre sí. Como se dijo anteriormente, este grado de concordancia se denomina precisión que por lo general, se expresa en términos de desviación estándar. La precisión se divide en dos parámetros que son repetibilidad y reproducibilidad.⁴⁷

1.3.1.2. REPETIBILIDAD

Se define la repetibilidad como la desviación estándar obtenida al analizar una misma muestra varias veces, en un periodo de tiempo corto, sin cambiar de equipo de medida, reactivos o analista.⁴⁷

1.3.1.3. REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad se define como la desviación estándar obtenida al analizar varias veces la muestra en días distintos, pudiendo variar condiciones tales como el equipo, reactivos o analistas. Se habla de reproducibilidad interlaboratorio cuando las medidas se realizan en laboratorios distintos (ensayos de intercomparación).^{47, 48}

La desviación estándar es una estadística confiable para expresar la precisión, la cual se expresa matemáticamente, las fórmulas de la desviación típica o estándar para datos no agrupados son de dos tipos muestral y poblacional, en este trabajo se hace uso de la desviación estándar muestral y se expresa de la siguiente manera:

$$\sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Donde:

X_i : cada uno de los valores

\bar{X} : media

s : desviación estándar

n : número de elementos

1.3.1.4. EXACTITUD

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado. Se expresará como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza.^{47, 48}

La recuperación esperada depende de la matriz de la muestra, del procedimiento de preparación de la muestra y de la concentración del analito en la misma. Aunque es deseable alcanzar valores de recuperación cercanos

al 100 %, en algunas muestras de matrices complejas solo se obtienen valores del 50, 80 o 90 %. En estos casos es importante que aunque la recuperación sea baja, la precisión del método sea alta ya que entonces puede intentarse aplicarse un factor de corrección. La desviación de la exactitud por exceso se produce cuando existen interferencias y la selectividad del método no es la adecuada, entonces se obtienen resultados superiores al valor verdadero, si se presenta este caso, si es posible, se debería modificar las condiciones del método para optimizar la selectividad o bien cambiar a otro alternativo que sea selectivo. La desviación de la exactitud por defecto suele producirse cuando la matriz de la muestra es compleja y la extracción del analito requiere varios pasos obteniéndose recuperaciones más bajas; cuando esto ocurre sería conveniente intentar optimizar la preparación de la muestra para mejorar el factor de recuperación.^{47, 48}

1.3.1.5. LINEALIDAD

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio.⁴⁷

Con el fin de determinar el rango lineal se puede realizar mediante un gráfico de concentración versus respuesta, que se conoce como Función Respuesta (normalmente llamada recta de calibrado). Ésta se establece cada día con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y los patrones de trabajos limpios de valor teórico conocido, que cubran el intervalo de trabajo.

En este sentido se recomienda abarcar valores desde cercano al cero y valores superiores al valor de interés. El número de puntos a analizar deberá ser establecido por el analista (en general, se utiliza un mínimo de 4 valores).^{47,48} Luego de realizar el gráfico se puede observar el comportamiento de la curva y establecer cualitativamente el rango lineal (figura 4). Después de establecer el comportamiento lineal del método se deberá realizar la Curva de trabajo o curva de calibración (figura 5). Graficar los datos de concentración de los estándares de calibración estimados v/s la lectura observada.⁴⁷

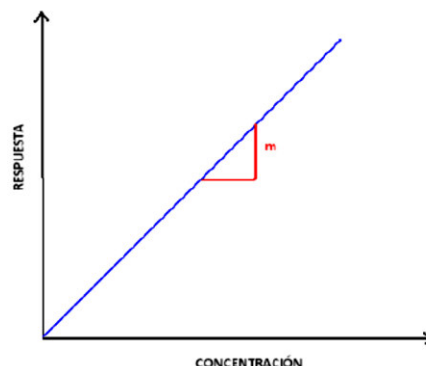
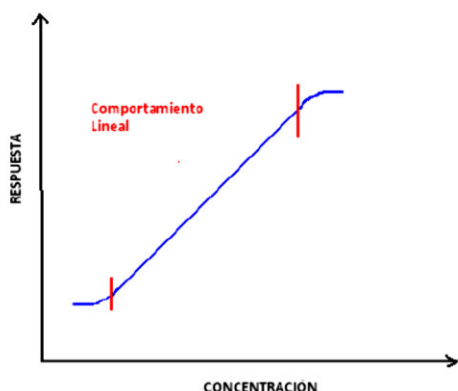


Figura 4. Comportamiento no lineal⁴⁷ Figura 5. Comportamiento lineal⁴⁷

LINEALIDAD DE ESTANDARES

Cálculo de la recta de regresión:

Ecuación de la recta:

$$y = b x + a$$

Donde :

x : concentración del analito

y : valor de la absorbancia

b : valor de la pendiente de la recta

a : valor del intercepto de la recta con el eje "y"

Fórmulas para hallar b:

$$b = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}$$

Fórmulas para hallar a:

$$a = y - b x = \frac{\sum y_i - b \sum x_i}{n}$$

Fórmulas para hallar “r”:

$$r = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sqrt{\left[\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \right] \left[\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n} \right]}}$$

Donde :

x : Concentración del analito

y : Valor de la absorbancia

r : Coeficiente de correlación

n : número de elementos

El límite de confianza para el estimador de la pendiente (b) se calcula en función de su varianza S_b :

$$S_b^2 = \frac{S_{y,x}^2}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}$$

$$S_{y,x}^2 = \frac{\sum y_i^2 - a \sum y_i - b \sum x_i y_i}{n - 2}$$

Intervalo de confianza de b = $b \pm t \times S_b$

El límite de confianza para el estimador de la ordenada al origen (a) se calcula en función de su varianza S_a :

$$S_a = \sqrt{S_b^2 \cdot \frac{\sum x_i^2}{n}}$$

Intervalo de confianza de a = $a \pm t \times S_a$

1.3.1.6. LÍMITE DE DETECCIÓN

En general este término se define como la mínima concentración del analito detectable por el método. Su determinación es importante (particularmente en análisis de trazas) pero los problemas asociados con ella son diversos; estos problemas han sido estadísticamente estudiados y varios criterios de decisión han sido propuestos. Aunque ninguno es universal uno de los más aceptables es el de la concentración que correspondería a la medida del “promedio del blanco + 3s”.^{47, 48}

El blanco es la señal emitida por el instrumento con una disolución que contiene las mismas especies que la muestra problema (pero sin el analito).

Para fines de estandarización se considera que deben hacerse 10 mediciones de blancos independientes, el valor de 3s se refiere a tres veces la desviación estándar al realizar la medición de estos blancos; cabe mencionar que la elección de estos blancos no siempre es fácil.^{47, 48}

1.3.1.7. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Llamado también límite de determinación, se define como la más pequeña concentración del analito que puede ser determinada con un nivel de exactitud y precisión aceptables. Se considera como la concentración de analito que corresponde al valor del promedio del blanco más 10 veces la desviación estándar del mismo.⁴⁷

Es importante hacer notar que ni el límite de detección ni el límite de cuantificación representan niveles a los cuales sea imposible la cuantificación del analito; el significado es que el límite de cuantificación representa la mínima concentración del analito que puede ser determinada con un aceptable nivel de incertidumbre.⁴⁷

1.3.1.8. RANGO DE APLICACIÓN

Establece desde dónde y hasta dónde el método funciona satisfactoriamente y para qué tipo de matriz. Intervalo de concentración del analito en la disolución que se mide, en el cual el método puede aplicarse con exactitud y precisión aceptables.⁴⁹

1.3.1.9. ESPECIFICIDAD

En todo método analítico hay un paso fundamental en el que se produce la medida de una señal relacionada con la concentración (análisis cuantitativo) o la presencia (análisis cualitativo) de un determinado analito. A veces, la presencia de otros compuestos, química o físicamente similares al analito, pueden contribuir a dicha señal, pudiendo causar un error sistemático en la determinación del analito. Estos compuestos pasan a denominarse interferencias. Es por tanto necesario asegurarse de donde procede la señal que se está midiendo. De aquí surge el concepto de selectividad, entendiéndose como el parámetro que define de forma cualitativa la extensión en que otras sustancias interfieren en la determinación de un analito usando un método determinado. Al máximo de selectividad se le denomina especificidad; es decir, un método será específico cuando la señal medida solo proviene del analito de interés.⁴⁷

1.4. IMPLEMENTACIÓN

La Real Academia Española define implementar como “poner en funcionamiento, aplicar métodos, medidas, etc., para llevar algo a cabo”.⁴⁹

Al implementar se desarrolla y evalúa de forma experimental que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para la aplicación prevista.⁵⁰

II. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. MUESTRA DE ESTUDIO

- Para realizar el presente trabajo de investigación experimental se recolectó 18 muestras de orina de niños de 5 a 7 años de edad de la Institución Educativa Particular María Inmaculada Concepción del distrito de Villa El Salvador de la provincia y región de Lima, Perú.
- Las muestras fueron recolectadas por la mañana en un volumen aproximado de 120 mL cada uno en frascos de polietileno estériles.
- Cada muestra fue rotulada y refrigerada entre 2 – 8 °C.

2.2. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1. MATERIALES

1. Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
2. Micropipetas de 100, 1000 y 5000 µL, marcas eppendorf Research plus
3. Gradilla
4. Matraz volumétrico de 25, 50, 100 y 250 mL, marca LBT
5. Frascos de polietileno

2.2.2. EQUIPOS

1. Espectrofotómetro UV visible, marca Termo scientific modelo HELIOS ZETA
2. Balanza analítica, marca A&D corporation limited, serie HR-250AZ (sensibilidad 0,1 mg)
3. Centrífuga ROTOFIX 32 A
4. Campana extractora
5. Refrigeradora

2.2.3. REACTIVOS

1. Piridina 99.5 % de pureza (Merck)
2. Cloruro de sulfonilbenceno Q.P. (Merck)
3. Ácido hipúrico 99,3 % de pureza (Merck)
4. Etanol absoluto (Merck)
5. Agua destilada (Ciatex)

2.3. PARAMETRO DE INCLUSIÓN

- 2.3.1. Orina de niños comprendidos entre 5 y 7 años de edad
- 2.3.2. Niños sin patología renal
- 2.3.2. Niños sin medicación

2.4. PARAMETRO DE EXCLUSIÓN

- 2.4.1. Jóvenes y adultos
- 2.4.2. Niños con alguna patología renal
- 2.4.3. Niños medicados
- 2.4.4. Ingesta de alimentos enlatados

2.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

2.5.1. MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO HIPÚRICO EN ORINA POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA VISIBLE

2.5.1.1. MÉTODO

El método fue realizado por espectrofotometría ultravioleta visible (Método 8300 NIOSH,1994) ⁵², el cual permite detectar la absorción o emisión de radiación electromagnética a ciertas longitudes de onda, de tal manera que se puede (mediante relaciones matemáticas) determinar la concentración de una sustancia desconocida.⁵¹ Esta técnica fue evaluada a partir de parámetros de estandarización como son: Sensibilidad, precisión, exactitud, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango de aplicación, especificidad.⁵⁰

2.5.1.2. RANGO DE MEDICIÓN

El rango de medición para el ácido hipúrico está comprendido entre 0,25 – 2,5 g/L.

2.5.1.3. FUNDAMENTO DE LA REACCIÓN

El ácido hipúrico forma complejo coloreado con cloruro de sulfonilbenceno en presencia de piridina formando un complejo coloreado que puede ser leído mediante el espectrofotómetro ultravioleta visible. El exceso de cloruro de sulfonilbenceno se detiene adicionando alcohol etílico posteriormente se lee a una absorbancia de 410 nm. ⁵²

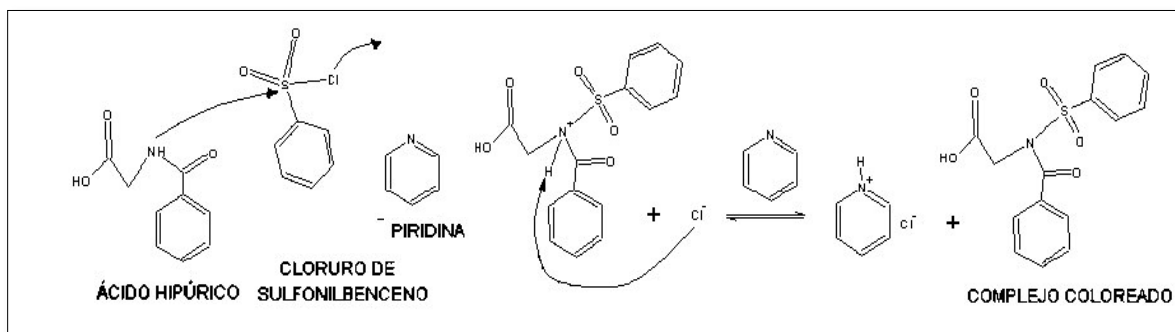


Figura 6. Reacción de ácido hipúrico y cloruro de sulfonilbenceno¹⁴

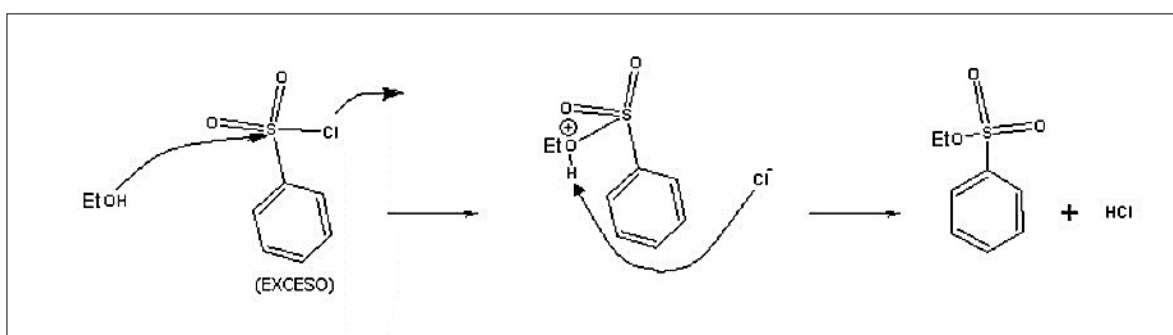


Figura 7. Reacción entre el etanol y cloruro de sulfonilbenceno¹⁴

2.5.1.4. MUESTRAS CON VALOR DE ÁCIDO HIPÚRICO CONOCIDO

Se contaminaron con ácido hipúrico estándar de referencia 18 muestras de orina (libres de ácido hipúrico) de niños comprendidos entre 5 a 7 años de edad de la Institución Educativa Particular María Inmaculada Concepción del distrito de Villa El Salvador de la provincia y región de Lima, Perú.

2.5.1.5. ESTANDARES

- **Ácido hipúrico estándar de referencia:** se hizo uso de este reactivo con una potencia de 99,3 % (Merck) como patrón de referencia para todos los ensayos.

2.6. PROCEDIMIENTO DE LA IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE ÁCIDO HIPÚRICO EN ORINA POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA VISIBLE

2.6.1. ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

La curva de calibración muestra una relación entre la absorbancia y la concentración (calibrado). La relación se expresó por una función matemática con la cual se pudo interpolar una absorbancia conocida y con ello se calculó concentración desconocida.

La solución stock se preparó a partir de 201,41 mg de ácido hipúrico al 99,3 % en un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a volumen con agua destilada; debido a que la potencia del ácido hipúrico se encuentra al 99,3 %, la solución tuvo $201,41 \times 99,3 \%$ mg, equivalente a 200,00013 mg de ácido hipúrico por cada 100 mL de solución por lo tanto la solución stock fue de 2,00013 mg/mL.

Los estándares se prepararon diluyendo la solución stock en agua destilada de tal manera que se obtuvo concentraciones de: 0,1 g/L; 0,2 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 1,2 g/L; 1,5 g/L y estas se prepararon de la siguiente manera:

- Estándar 1: Se realizó una dilución de 5 mL de la solución stock y se enrasó con agua destilada en un matraz volumétrico de 100 mL.
- Estándar 2: Se realizó una dilución de 10 mL de la solución stock y se enrasó con agua destilada en un matraz volumétrico de 100 mL.
- Estándar 3: Se realizó una dilución de 25 mL de la solución stock y se enrasó con agua destilada en un matraz volumétrico de 100 mL.

- Estándar 4: Se realizó una dilución de 50 mL de la solución stock y se enrasó con agua destilada en un matraz volumétrico de 100 mL.
- Estándar 5: Se realizó una dilución de 60 mL de la solución stock y se enrasó con agua destilada en un matraz volumétrico de 100 mL.
- Estándar 6: Se realizó una dilución de 75 mL de la solución stock y se enrasó con agua destilada en un matraz volumétrico de 100 mL.

El rango de concentración para la curva de calibración es de 0,25 – 2,5 g/L

Como blanco se utilizó alcohol etílico absoluto.

Tabla 2. Preparación de estándares para la realización de la curva de calibración del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

Estándares	Cálculos*	Concentración de ácido hipúrico (mg/mL)	Concentración final de ácido hipúrico (g/L)
Stock	$\frac{201,41 \text{ mg} \times 99,3 \%}{100 \text{ mL}}$	2,00013 mg/mL	2,00013 g/L
Estándar 1	$2,00013 \text{ mg/mL} \times \frac{5 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}$	0,10000 mg/mL	0,10000 g/L
Estándar 2	$2,00013 \text{ mg/mL} \times \frac{10 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}$	0,20000 mg/mL	0,20000 g/L
Estándar 3	$2,00013 \text{ mg/mL} \times \frac{25 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}$	0,50000 mg/mL	0,50000 g/L
Estándar 4	$2,00013 \text{ mg/mL} \times \frac{50 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}$	1,0000 mg/mL	1,0000 g/L
Estándar 5	$2,00013 \text{ mg/mL} \times \frac{60 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}$	1,2000 mg/mL	1,2000 g/L
Estándar 6	$2,00013 \text{ mg/mL} \times \frac{75 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}$	1,5000 mg/mL	1,5000 g/L
Blanco	Etanol absoluto	0,0000 mg/mL	0,0000 g/L

* Las diluciones fueron realizadas con agua destilada

Las muestras (orinas libres de ácido hipúrico) recolectadas de la Institución Educativa Particular antes mencionada fueron contaminadas con ácido hipúrico hasta obtener: 0,1 g/L; 0,2 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 1,2 g/L y 1,5 g/L de ácido hipúrico por litro de orina y estas fueron analizadas por triplicado, en días diferentes y por 3 analistas distintos.

Tabla 3. Preparación de las muestras para la cuantificación de ácido hipúrico por el método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

Muestras	Cálculos**	Concentración de ácido hipúrico (mg/mL)	Concentración de ácido hipúrico (g/L)
Muestra 1 (M1)	$\frac{0,1007 \text{ mg} \times 99,3\%}{100 \text{ mL}}$	0.1 mg/mL	0.1 g/L
Muestra 2 (M2)	$\frac{0,2014 \text{ mg} \times 99,3\%}{100 \text{ mL}}$	0,2 mg/mL	0,2 g/L
Muestra 3 (M3)	$\frac{0,5035 \text{ mg} \times 99,3\%}{100 \text{ mL}}$	0,5 mg/mL	0,5 g/L
Muestra 4 (M4)	$\frac{1,007 \text{ mg} \times 99,3\%}{100 \text{ mL}}$	1,0 mg/mL	1,0 g/L
Muestra 5 (M5)	$\frac{1,2084 \text{ mg} \times 99,3\%}{100 \text{ mL}}$	1,2 mg/mL	1,2 g/L
Muestra 6 (M6)	$\frac{1,5105 \text{ mg} \times 99,3\%}{100 \text{ mL}}$	1,5 mg/mL	1,5 g/L
Muestra 7 (M7)	$\frac{0,1007 \text{ mg} \times 99,3\%}{100 \text{ mL}}$	0.1 mg/mL	0.1 g/L
Muestra 8 (M8)	$\frac{0,2014 \text{ mg} \times 99,3\%}{100 \text{ mL}}$	0,2 mg/mL	0,2 g/L
Muestra 9 (M9)	$\frac{0,5035 \text{ mg} \times 99,3\%}{100 \text{ mL}}$	0,5 mg/mL	0,5 g/L
Muestra 10 (M10)	$\frac{1,007 \text{ mg} \times 99,3\%}{100 \text{ mL}}$	1,0 mg/mL	1,0 g/L
Muestra 11 (M11)	$\frac{1,2084 \text{ mg} \times 99,3\%}{100 \text{ mL}}$	1,2 mg/mL	1,2 g/L
Muestra 12 (M12)	$\frac{1,5105 \text{ mg} \times 99,3\%}{100 \text{ mL}}$	1,5 mg/mL	1,5 g/L
Muestra 13 (M13)	$\frac{0,1007 \text{ mg} \times 99,3\%}{100 \text{ mL}}$	0.1 mg/mL	0.1 g/L

Muestra 14 (M14)	$\frac{0,2014 \text{ mg} \times 99,3\%}{100 \text{ mL}}$	0,2 mg/mL	0,2 g/L
Muestra 15 (M15)	$\frac{0,5035 \text{ mg} \times 99,3\%}{100 \text{ mL}}$	0,5 mg/mL	0,5 g/L
Muestra 16 (M16)	$\frac{1,007 \text{ mg} \times 99,3\%}{100 \text{ mL}}$	1,0 mg/mL	1,0 g/L
Muestra 17 (M17)	$\frac{1,2084 \text{ mg} \times 99,3\%}{100 \text{ mL}}$	1,2 mg/mL	1,2 g/L
Muestra 18 (M18)	$\frac{1,5105 \text{ mg} \times 99,3\%}{100 \text{ mL}}$	1,5 mg/mL	1,5 g/L
Blanco	Orina libre de ácido hipúrico	1,5 mg/mL	1,5 g/L

** Las diluciones se realizaron con orinas libres de ácido hipúrico

De cada uno de estas muestras se retiró 0,5 mL y se llevó con una micropipeta a cada tubo con su respectivo rotulado, a cada tubo se añadió 0,5 mL de piridina, así como también 0,2 mL de cloruro de bencensulfonilo, se homogenizó por un minuto y se dejó reposar por media hora, luego se añadió 5,0 mL de etanol absoluto y se leyó por espectrofotometría ultravioleta visible a una longitud de onda de 410 nm, como blanco se utilizó orina libre de ácido hipúrico.

Esta operación se realizó por triplicado por tres analistas en diferentes tiempos. La muestra se sometió a distintos procesos para alterar las concentraciones de la matriz de concentración conocida y se procedió a realizar la lectura de especificidad como indica la tabla 4.

Tabla 4. Ensayos propuestos para determinar la especificidad del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

Ensayo	Procedimiento	Numero de ensayos
Degradación por calor	Se somete la muestra a 60°C x 6 horas	3
Degradación por oxidantes	Se adicional a la muestra peróxido de hidrogeno	3
Degradación por pH	Se le adiciona a la muestra ácido y bases (pH = 1 y pH =9)	3
Degradación por contaminación	Se incorpora a la muestra	3

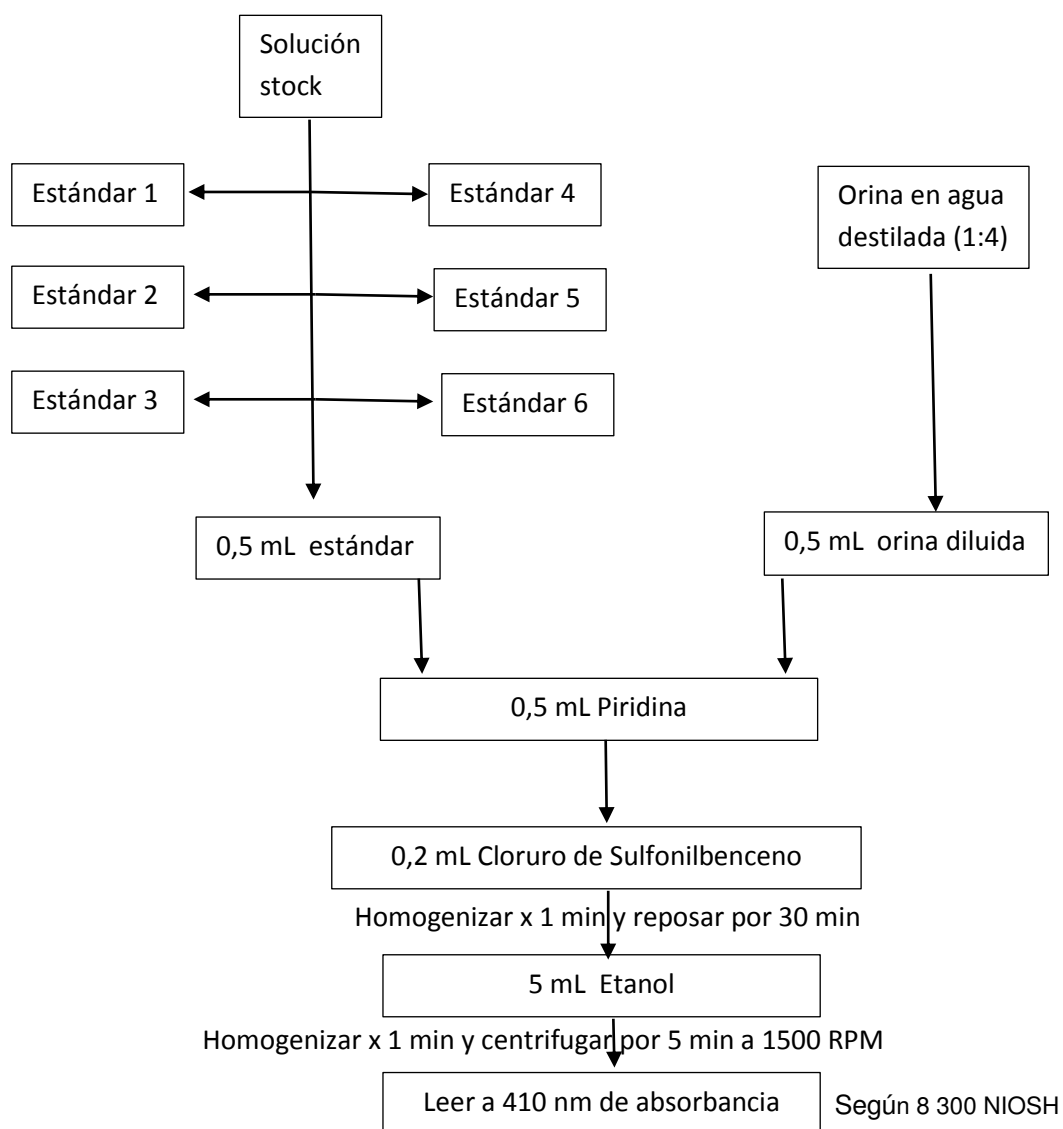


Figura 8. Procedimiento para la cuantificación de ácido hipúrico por el método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

2.6.2. DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA ÓPTIMA

Considerando que la absorción de soluciones de coloración amarillenta se da entre los rangos de 350 y 500 nm, se optó por utilizar las soluciones de 0,1 g/L y 1,5 g/L de ácido hipúrico estándar, las que fueron sometidas a diferentes longitudes de onda como: 350 nm; 360 nm; 370 nm; 380 nm; 390 nm; 400 nm; 410 nm; 420 nm; 430 nm; 440 nm; 450 nm; 460 nm; 470 nm; 480 nm; 490 nm y 500 nm, de las cuales se obtuvo una mayor absorción a 410 nm, por la que se consideró como la longitud de onda óptima para el desarrollo del método propuesto.

III. RESULTADOS

El límite de detección del ácido hipúrico fue de 0,005 g/L y el límite de cuantificación fue de 0,075 g/L.

El rango de aplicación comprende desde 0,1 g/L hasta 1,5 g/L a partir de concentraciones mayores a 1,5 g/L ya no cumple con la linealidad del método como se observa en la figura 9.

Tabla 5. Rango de aplicación obtenido del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

CONCENTRACIÓN (g/L)	ABSORBANCIAS OBTENIDAS
0,1	0,079
0,2	0,146333333
0,5	0,485
1,0	1,023333333
1,2	1,26
1,5	1,53
1,75	1,64
2,0	1,68

La tabla 6 nos indica las absorbancias obtenidas por los analistas 1, 2 y 3 en las distintas concentraciones del ácido hipúrico en orina. Las tablas 7, 8 y 9; figuras 9, 10 y 11 hacen referencia a los resultados obtenidos de los analistas 1, 2 y 3, respectivamente.

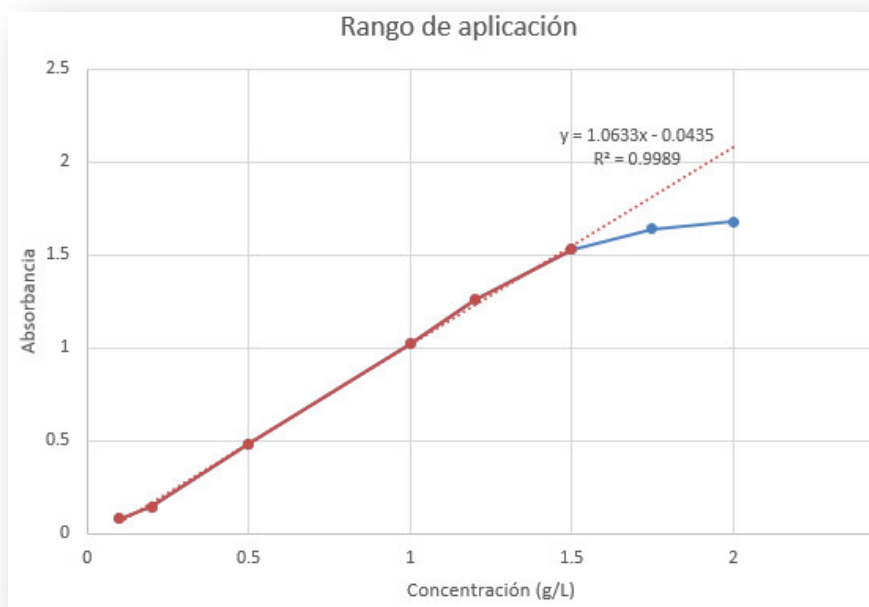


Figura 9. Rango de aplicación obtenido del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

Tabla 6. Absorbancias obtenidas del proceso de estandarización del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO HIPÚRICO (g/L)	ANALISTA 1 DÍA 1			ANALISTA 2 DÍA 2			ANALISTA 3 DÍA 3		
	ABSORBANCIAS			ABSORBANCIAS			ABSORBANCIAS		
0,1	0,079	0,078	0,080	0,06	0,09	0,08	0,08	0,085	0,07
0,2	0,146	0,146	0,147	0,161	0,14	0,14	0,11	0,17	0,14
0,5	0,48	0,485	0,49	0,5	0,45	0,47	0,41	0,48	0,53
1,0	1,01	1,03	1,03	1,06	1,09	1,08	1,09	1,06	1,05
1,2	1,27	1,24	1,27	1,27	1,28	1,3	1,3	1,29	1,31
1,5	1,51	1,55	1,53	1,51	1,53	1,56	1,55	1,59	1,58

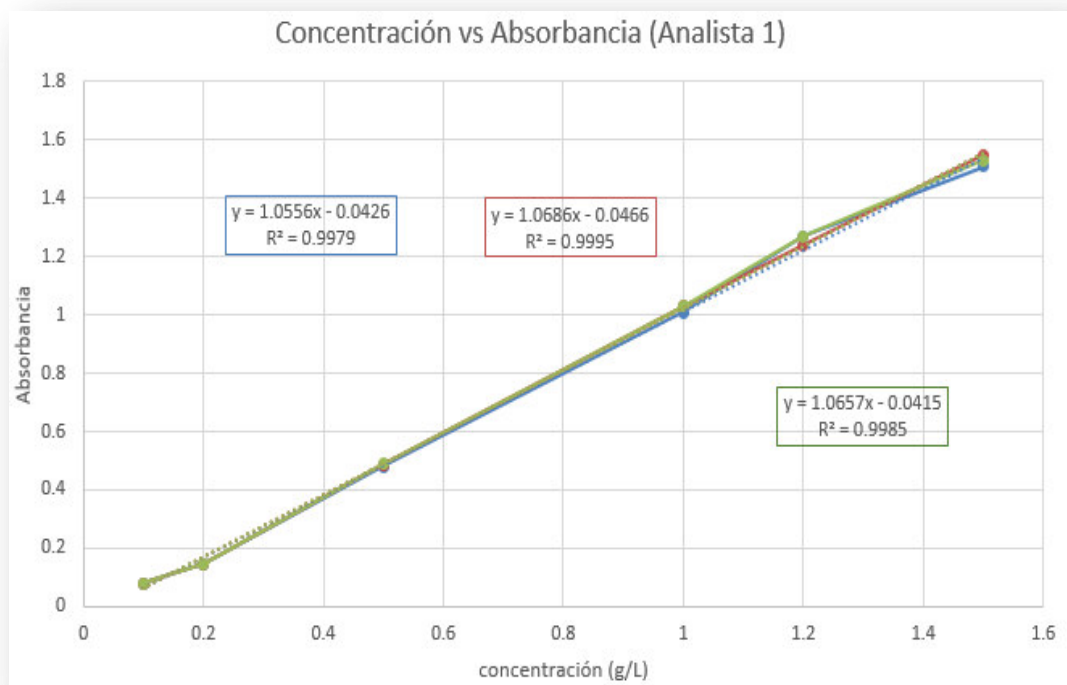


Figura 10. Ecuaciones de recta Concentración vs Absorbancia obtenidos por triplicado del Analista 1 durante la implementación del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

Tabla 7. Estadística de las absorbancias obtenidas del analista 1 durante la implementación del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

Concentración (g/L)	0,1	0,2	0,5	1,0	1,2	1,5
Promedio	0,079	0,146	0,485	1,023	1,260	1,530
Desviación estándar	0,001	0,001	0,005	0,012	0,017	0,020

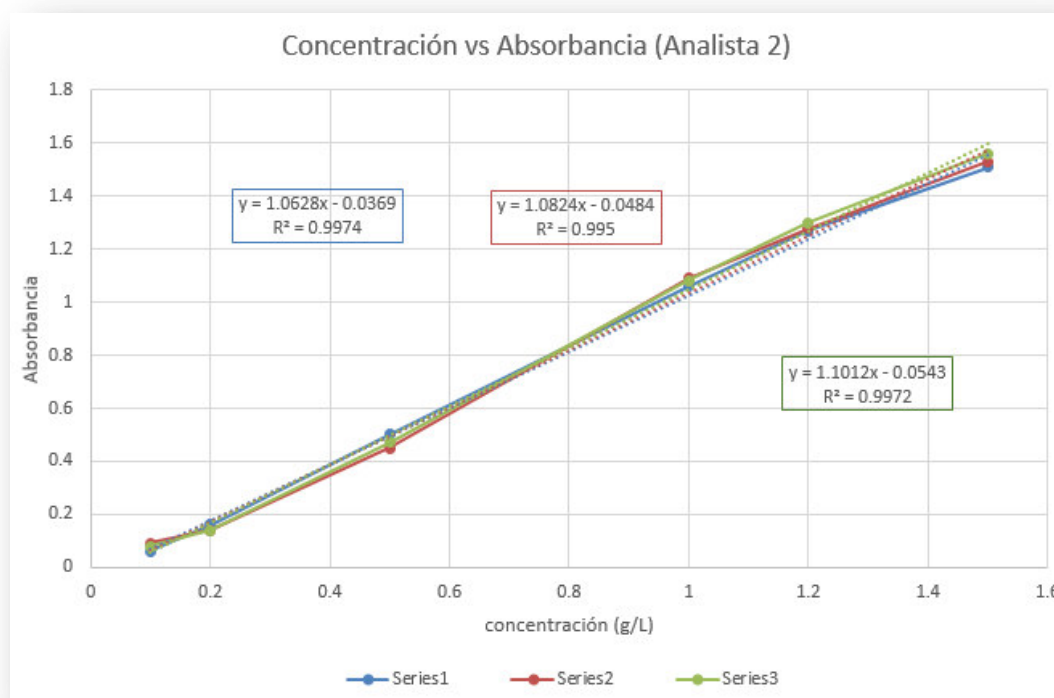


Figura 11. Ecuaciones de recta Concentración vs Absorbancia obtenidos por triplicado del Analista 2 durante la implementación del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

Tabla 8. Estadística de las absorbancias obtenidas del analista 2 durante la implementación del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

Concentración (g/L)	0,1	0,2	0,5	1,0	1,2	1,5
Promedio	0,077	0,147	0,473	1,077	1,283	1,533
Desviación estándar	0,015	0,012	0,025	0,015	0,015	0,025

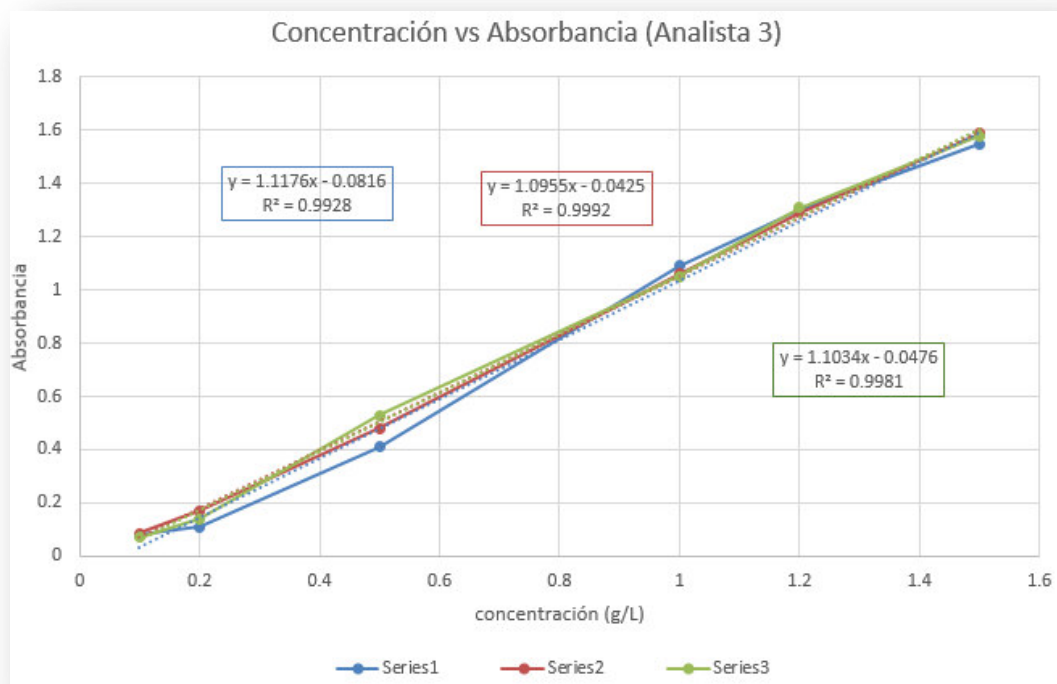


Figura 12. Ecuaciones de recta Concentración vs Absorbancia obtenidos por triplicado del Analista 3 durante la implementación del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

Tabla 9. Estadística de las absorbancias obtenidas del analista 3 durante la implementación del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

Concentración (g/L)	0,1	0,2	0,5	1,0	1,2	1,5
Promedio	0,078	0,140	0,473	1,067	1,300	1,573
Desviación estándar	0,008	0,030	0,060	0,021	0,010	0,021

Tabla 10. Precisión de los analistas 1, 2 y 3 durante la implementación del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

Concentración (g/L)	0,1	0,2	0,5	1,0	1,2	1,5
A1	0,079	0,146	0,480	1,010	1,270	1,510
A2	0,078	0,146	0,485	1,030	1,240	1,550
A3	0,080	0,147	0,490	1,030	1,270	1,530
Promedio	0,079	0,146	0,485	1,023	1,260	1,530
desviación estándar	0,001	0,001	0,005	0,012	0,017	0,020
Coeficiente de variación (%)	1,266	0,395	1,031	1,128	1,375	1,307

Tabla 11. Exactitud del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible por ensayo de recuperación

Muestras	Muestra contaminada con 0,1 g/L de ácido hipúrico	Muestra contaminada con 0,25 g/L de ácido hipúrico	Muestra contaminada con 0,5 g/L de ácido hipúrico
Absorbancias	0,134	0,271	0,508
	0,133	0,274	0,506
	0,134	0,272	0,508
Absorbancia. Media	0,134	0,272	0,504
Desviación estándar	0,001	0,002	0,001
Coeficiente de variación (CV)	0,432	0,561	0,229
Porcentaje de recuperación (%)	97,90	98,20	98,42

Tabla 12. Precisión intermedia (reproducibilidad) del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible por ensayo de recuperación

Concentración (g/L)	0,1	0,2	0,5	1,0	1,2	1,5
Analista 1	0,079	0,146	0,485	1,023	1,260	1,530
Analista 2	0,077	0,147	0,473	1,077	1,283	1,533
Analista 3	0,078	0,140	0,473	1,067	1,300	1,573
Promedio	0,078	0,144	0,477	1,056	1,281	1,546
Desviación estándar	0,001	0,004	0,007	0,028	0,020	0,024
Coefficiente de variación (%)	1,541	2,675	1,411	2,686	1,568	1,560

La curva de calibración (Figura 13) se obtuvo por la absorbancia de diferentes concentraciones de ácido hipúrico en el intervalo de 0,1 a 1,5 g/L. Se obtuvo el valor de 0,9989 para el coeficiente de determinación (r^2), así como el coeficiente de variación de 1,27 %. La linealidad determina la región de la curva respuesta o de cuantificación en la existe relación directa entre la señal instrumental y la concentración del producto analizado, siendo un método lineal cuando presenta una $r^2 > 0,99$.

El análisis estadístico de regresión (Anexo 1) determinó un intercepto de

- 0,04354 que es significativamente diferente de cero (*valor p* ≤ 0.05). El valor de la pendiente 1,0633 resultó ser significativo con una probabilidad menor que 0,05, es decir 0,000.

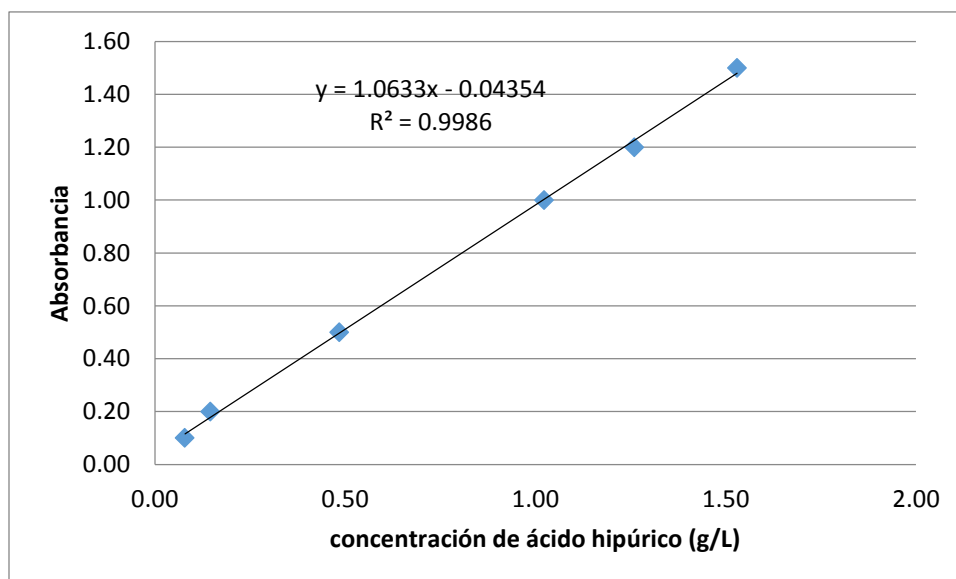


Figura 13. Curva de calibración del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

Para los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad (Tabla 14) se apreciaron valores de CV = 1,08 % y la reproducibilidad 1,91 %.

Tabla 13. Parámetros de estandarización en función del coeficiente de variación (CV)

PARÁMETROS DE ESTANDARIZACIÓN	CRITERIO ESTABLECIDO EN FUNCIÓN DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)	COEFICIENTE DE RECOBRO
Linealidad	≤ 1.5	97-103 %
Repetibilidad	≤ 1.5	97-103 %
Reproducibilidad	$\leq 3,0$	97-103 %
Exactitud	$\leq 3,0$	97-103 %

Tabla 14. Parámetros del proceso de estandarización del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

PARÁMETROS DETERMINADOS EN LA ESTANDARIZACIÓN				
	LINEALIDAD	REPETIBILIDAD	REPRODUCIBILIDAD	EXACTITUD
	(%)	(%)	(%)	(%)
Método	$r = 0,9993$			$R = 98,1$
propuesto para				
cuantificar	$r^2 = 0,9986$			$CV = 3,0$
ácido hipúrico				
	$CV = 1,27$	$CV = 1,08$	$CV = 1,91$	
	$r \geq 0,99$			
Criterios	$r^2 \geq 0,98$			$R = 97 - 103$
establecidos	$CV \leq 1,5$	$CV \leq 1,5$	$CV \leq 3,0$	$CV \leq 3,0$

Tabla 15. Resumen de parámetros del método estandarización e implementación de un método analítico para determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

PARÁMETROS DE ESTANDARIZACIÓN	RESULTADOS	CRITERIO ESTABLECIDO EN FUNCIÓN DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)	COEFICIENTE DE RECOBRO
Linealidad	1,27	$\leq 1,5$	98,1 %
Repetibilidad	1,08	$\leq 1,5$	
Reproducibilidad	1,91	$\leq 3,0$	
Exactitud	3,0	$\leq 3,0$	

Tabla 16. Aceptación de la hipótesis nula (H_0) y rechazo de la hipótesis alternativa (H_1) del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

	LINEALIDAD		REPETIBILIDAD	REPRODUCIBILIDAD	EXACTITUD	
H_0	$\mu \geq 0,98$	$\mu \leq 1,5$	$\mu \leq 1,5$	$\mu \leq 3,0$	$97 \leq \mu \leq 103$	$\mu \leq 3,0$
H_1	$\mu < 0,98$	$\mu > 1,5$	$\mu > 1,5$	$\mu > 3,0$	$97 > \mu > 103$	$\mu > 3,0$
Resultado	$r^2 = 0,9986$	$CV = 1,27$	$CV = 1,08$	$CV = 1,91$	$R = 98,1$	$CV = 3,0$

Por su parte la exactitud (Tabla 11), brindó valores de coeficientes de recobro R de 97,90; 98,20 y 98,2 %, así como coeficiente de variación de 0,432; 0,561 y 0,229 para las concentraciones de 0,1; 0,25 y 0,5 g/L de patrón, respectivamente. El porcentaje de ácido hipúrico recuperado muestra que el método presenta exactitud, es decir, que los valores obtenidos en la determinación están próximos al valor verdadero.

La linealidad determina la región de la curva respuesta o de cuantificación en que hay relación directa entre la señal instrumental y la concentración del producto analizado. En la evaluación de linealidad del método se pudo constatar que los valores de coeficientes de correlación r para el método evaluado, se acercaron bastante a la unidad, además de obtener coeficientes de determinación R^2 , coeficientes de variación, pendientes e interceptos dentro de los límites exigidos. Por lo tanto, se puede afirmar que existe una buena correlación entre la concentración y la respuesta obtenida (valores de absorbancia).

La precisión, evaluada como repetibilidad y reproducibilidad, mostró resultados satisfactorios, pues los coeficientes de variación determinados en ambos métodos cumplieron con el criterio de aceptación.

El método demuestra que los resultados obtenidos están comprendidos dentro del intervalo de la hipótesis nula por lo tanto se rechaza la hipótesis alternativa.

La exactitud da cuenta de la proximidad entre el resultado obtenido por un método y el valor “real”. Es un parámetro que expresa la proximidad de la media de una serie de resultados obtenidos con el método al valor real. Este parámetro se evaluó por medio del coeficiente de recobro R y el coeficiente de variación CV. Como se puede evidenciar en la Tabla 14, los métodos propuestos son exactos, ya que los valores de porcentajes de recobro y coeficientes de variación se encuentran dentro del intervalo establecido.

En el caso de la especificidad del método a los productos de degradación se demostró la no existencia de diferencias significativas entre las lecturas obtenidas de ácido hipúrico y las que contienen productos de degradación. Esto confirma que los productos de degradación no interfieren en la cuantificación del ácido hipúrico lo que guarda relación con lo propuesto por NIOSH.

Tabla 17. Especificidad del método analítico propuesto para la determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible

Ensayo	Resultado
Degradación por calor	No se reportó interferencia en los resultados
Degradación por oxidantes	No se reportó interferencia en los resultados
Degradación por pH	No aplica
Degradación por contaminación	No se reportó interferencia en los resultados

IV. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se desarrolló una técnica analítica que utiliza menos reactivos, menor cantidad de tiempo el cual permite procesar mayor número de muestras en comparación con el método de R. J. Flanagan y col..

La curva de calibración cumple con la ley de Lambert-Beer en un rango de absorbancia de 0,000 y no más de 2,000.

En cuanto al análisis de varianza (Anexo 2) para evaluar la precisión entre tres analistas, no se presentó diferencias estadísticamente significativas, (*valor $p \geq 0,05$*) lo que implica que el método es preciso considerando el criterio estadístico de Levone.

No se encontró diferencias estadísticas en las cuantificaciones de ácido hipúrico de muestras de orina evaluadas por el método propuesto por los tres analistas en diferentes días del mismo modo que refiere Levone (Anexo 3).

La pendiente de la recta ($y = bx + a$) es estadísticamente distinta de cero, , si $b = 0$ significaría que la ecuación de la recta quedaría de la forma $y = 0x + a$ $\Leftrightarrow y = a$, por lo tanto la ecuación sería paralela al eje de las abscisas y con ello no se tendría la regresión lineal conforme se establece en los criterios matemáticos y estadísticos.

V. CONCLUSIONES

1. El método de estandarización e implementación de un método analítico para determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible cumple con los parámetros de estandarización: Precisión, repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, linealidad, especificidad; al 98,1 % del porcentaje de recobro en función al coeficiente de variación calculado.
2. Se implementó el método de estandarización e implementación de un método analítico para determinación de ácido hipúrico en orina por espectrofotometría ultravioleta visible, desarrollando y evaluando los parámetros de estandarización en función al coeficiente de variación de cada parámetro de estandarización realizado.

VI. RECOMENDACIONES

1. Implementar el uso de la técnica analítica estandarizada en esta monografía para el análisis de ácido hipúrico en orina en el Centro de Información, Control Toxicológico y Apoyo a la Gestión Ambiental (Cicotox) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos proporcionando de esta manera un manejo eficiente de tiempos de análisis y costos.
2. Para una mayor familiarización con el método preparar una solución intermedia de 1,0 g/L o 1,2 g/L, con ello nos daremos cuenta si nuestras muestras a analizar están por encima o por debajo de esta solución intermedia.
3. Es un método que no implica un costo elevado, como un HPLC, en su realización y que puede ser reproducible en laboratorios de baja complejidad en un menor tiempo en comparación con otros métodos espectrofotométricos y que además es muy confiable en su realización y obtención de resultados.
4. Desarrollar un programa de estandarización de las técnicas analíticas debido al aumento de analitos para dar resultados con un mejor performance en tiempo y costo.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mercado F. Nuevos datos sobre la toxicocinética del tolueno para el monitoreo biológico de la exposición ocupacional. *Rev Latinoam la Salud en el Trab.* 2004;4(2):52–5.
2. Eisenberg DP. Neurotoxicity and Mechanism of Toluene Abuse. *J Biol Med.* 2003;19:150–9.
3. Umberger C, Fiorese F. Colorimetric method for hippuric acid. *Clin Chem.* 1963;9:91.
4. Khel H. Hippuric acid analysis of urine using the Hofmann rearrangement. *Clin Chem.* 1967;13:475–81.
5. Ogata M, Tomokuni K, Takatsuka Y. Quantitative determination in urine of hippuric acid and m-or p-methylhippuric acid, metabolites of toluene and m-or p-xylene. *Brit J Ind Med.* 1969;26:330–4.
6. Ogata M, Takatsuka Y, Tomokuni K. Excretion of hippuric acid and m- or p-methylhippuric acid in the urine of persons exposed to vapours of toluene and m- or p-xylene in an exposure chamber and in workshops, with specific reference to repeated exposures. *Brit J Ind Med.* 1971;28:382–5.
7. Ogata M, Takatsuka Y, Tomokuni K. Urinary excretion of hippuric acid and m-or p-methylhippuric acid in the urine of persons exposed to vapours of toluene and m- or p-xylene as a test of exposure. *Brit J Ind Med.* 1970;27:43–50.
8. Trejo-Bahena N, Pérez-astudillo L, Orhuela-Henry J, Balderasa-Cornelio A, Salinas-Cano F, Martínez-martínez C, et al. Estudio comparativo para determinar ácido hipúrico (HA) en orina mediante los métodos colorimétricos de Ogata y de Astudillo. *Rev Sanid Milit Mex.* 2008;62(1):35–41.

9. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. MTA/MB-022/A95. Determinación de los ácidos fenilglicoxílico, mandélico, hipúrico y orto y para - metilhipúrico en orina - Método de fase reversa con detector de ultravioleta / Cromatografía líquida de alta resolución.
10. Organización Internacional del Trabajo. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. España - Madrid; 1999.
11. Fabr  R, Truhaut R. Tratado de Toxicología. España - Madrid: Editorial Paraninfo S.A.; 1976.
12. Morrison R, Boyd R. QUÍMICA ORGÁNICA. 3ra Ed. México: Ed. Fondo Educativo Interamericano; 1985. 521-527 p.
13. OIT (Organización Internacional del Trabajo). Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. España - Madrid: Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. Subdirección General de Publicaciones; 1998.
14. Junes R, Lookuy C. Determinación de ácido hipúrico en orina como indicador de exposición al tolueno en trabajadores de imprentas en los distritos de la provincia de Lima (Tesis). Lima - Perú: Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Mayor de San Marcos; 2009.
15. McMurry J. Química Orgánica. Quinta Edi. México: Ed. International Thomson Editores, S.A; 2001.
16. Nise G, Attewell R, Skerfving S, Orbaek P. Elimination of toluene from venous blood and adipose tissue after occupational exposure. Br J Ind Med. 1989;46:407–11.
17. Pyykko K, Tahti H, Vappatalo H. Toluene concentrations in various tissues of rats after inhalation and oral administration. Arch Toxicol. 1977;38(3):169–75.
18. Environmental Protection Agency (EPA). Toxicological Review of Toluene. Washington D.C. - U.S.; 2005.

19. Dutkiewicz T, Tyras H. The quantitative estimation of toluene skin absorption in man. *Int Arch Gewerbepathol Gewerbehyg.* 1968;24:253–7.
20. Cohr KH, Stokholm J. Toluene. A toxicologic review. *Scand J Work Environ Heal.* 1979;5:71–90.
21. Mendoza Cancho VS, Vela Chamoly JC. Cuantificación de ácido hipúrico como indicador biológico de exposición al tolueno en trabajadores de imprentas del distrito del Cercado de Lima. Tesis. Lima - Perú: Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Mayor de San Marcos; 2016.
22. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Draft Toxicological Profile for Toluene. Atlanta: U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES; 2015.
23. Tassaneeyakul W, Birkett D, Edwards J, Veronese M, Tassaneeyakul W, Tukey R, et al. Human cytochrome P450 isoform specificity in the regioselective metabolism of toluene and o-, m- and p-xylene. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;276(1):101–8.
24. Campo P, Blachère V, Payan JP, Cossec B, Ducos P. Toluene toxicokinetics and metabolism parameters in the rat and guinea pig. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2006;21:276–82.
25. Nakajima T, Wang R. Induction of cytochrome P450 by toluene. *Int J Biochem.* 1994;26(12):1333–40.
26. Nakajima T, Wang R, Elovaara E, Gonzalez F, Gelboin H, Raunio H, et al. Toluene metabolism by cDNA-Expressed human hepatic cytochrome P450. *Biochem Pharmacol.* 1997;53(3):271–7.
27. Nise G, Orbaek P. Toluene in venous blood during and after work in rotogravure printing. *Int Arch Occup Env Heal.* 1988;60:31–5.
28. Pérez L, Miranda V. Determinación de fenoles, ácido hipúrico y ácido metilhipúrico en orina como indicadores biológicos de exposición al benceno,

- tolueno y xileno en trabajadores expuestos en una fábrica de caucho en Lima metropolitana. Tesis. Lima - Perú: Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Mayor de San Marcos; 2014.
29. Ikeda M, Ohtsui H. Significance of urinary hippuric acid determination as an index of toluene exposure. *Brit J Ind Med*. 1969;26:244–6.
 30. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España. Madrid-E. Ministerio de Empleo y Seguridad Social. Gobierno de España; 2016.
 31. Páez-Martínez N, López-Rubalcava C, Cruz SL. Avances recientes en la investigación de los mecanismos celulares de acción de los disolventes de abuso. *Salud Ment*. 2003;26(5):43–50.
 32. Domínguez Escribà L. Efectos de la cocaína y del tolueno sobre la neurogénesis en el hipocampo de rata. [Tesis doctoral]. Valencia - España: Departamento de Biología Celular y Parasitología. Universidad de Valencia; 2010.
 33. Cruz SL, Orta-Salazar G, Gauthereau MY, Millan-Perez Peña L, Salinas-Stefanón EM. Inhibition of cardiac sodium currents by toluene exposure. *Br J Pharmacol*. 2003;140(4):653–60.
 34. Ameno K, Fuke C, Ameno S, Kiriu T, Sogo K, Ijiri I. A fatal case of oral ingestion of toluene. *Forensic Sci Int*. 1989;41:255–60.
 35. Filley CM, Halliday W, Kleinschmidt-Demasters BK. The Effects of Toluene on the Central Nervous System. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004;63(1):1–12.
 36. Baelum J, Andersen IB, Lundqvist GR, Mølhave L, Pedersen OF, Vaeth M, et al. Response of solvent-exposed printers and unexposed controls to six-hour toluene exposure. *Scand J Work Environ Heal*. 1985;11(4):271–80.
 37. Peralta DP, Chang AY. Toluene inducing acute respiratory failure in a spray paint sniffer. *Am J Case Rep*. 2012;13:92–5.

38. Yasar S, Yildirim E, Koklu M, Gursoy E, Celik M. A case of reversible cardiomyopathy associated with acute toluene exposure. *Turkish J Emerg Med.* 2016;16(3):123–5.
39. Faus Soler M, Soler Compañy E, Perez Castelló I, Orosa Fernández P, Cuenc Soria A. Taquicardia Ventricular por Inhalación Accidental de Tolueno Utilizado como Solvente en una Laca Insecticida. *Farm Hosp.* 1999;23:73–6.
40. NIELSEN HK, KRUSELL L, BÆLUM J, LUNDQVIST G, OMLAND Ø, VÆTH M, et al. Renal Effects of Acute Exposure to Toluene. *Acta Med Scand.* 1985;218(3):317–21.
41. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Toluene. WHO. In: *Chemical Environmental Health Criteria* 52. Geneva; 1986.
42. WHO Regional Office for Europe. Chapter 5.14 Toluene. In: *Air Quality Guidelines - Second Edition*. Copenhagen - Denmark; 2000. p. 9.
43. Campagna D, Stengel B, Mergler D, Limasset JC, Diebold F, Michard D, et al. Color vision and occupational toluene exposure. *Neurotoxicol Teratol.* 2001;23(5):473–80.
44. Haro-García L, Vélez-Zamora N, Aguilar-Madrid G, Guerrero-Rivera S, Sánchez-Escalante V, Muñoz SR, et al. Alteraciones hematológicas en trabajadores expuestos ocupacionalmente a mezcla de benceno-tolueno-xileno (BTX) en una fábrica de pinturas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2012;29(2):181–7.
45. Public Health England (PHE). *Compendium of Chemical Hazards: Toluene Toxicological overview*. England - UK; 2015.
46. Nathanael J McKeown D. MEDSCAPE. *Toluene Toxicity Treatment & Management*. 2015.
47. Aguirre Ortega L et al. *Validación de Métodos Análíticos*. España: Ed. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria; 2001.

48. Miller JN, Miller JC. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. España - Madrid: Prentice Hall; 2002.
49. Eurolab España. Guía Eurachem. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos. Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados. España: EURACHEM-España; 2016.
50. Farmacopea de los EE.UU, USP 40 & NF 35. Rockville, MD.: The United States Pharmacopeial Convention Inc; 2017.
51. Skoog DA, Holler FJ, Nieman T. Principios de Análisis Instrumental. Quinta Edición. Madrid - España: Editorial Mc Graw Hill; 2000.
52. NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM). Hippuric Acid in Urine: Method 8300. 4th edition. U.S. Department of Health and Human Services; 1994.

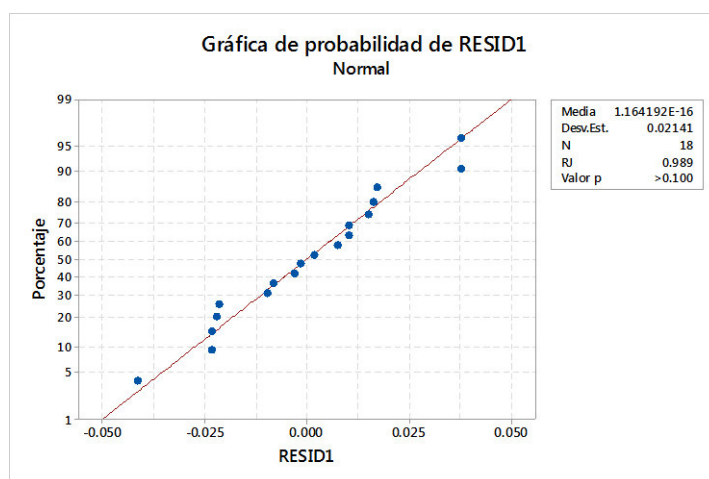
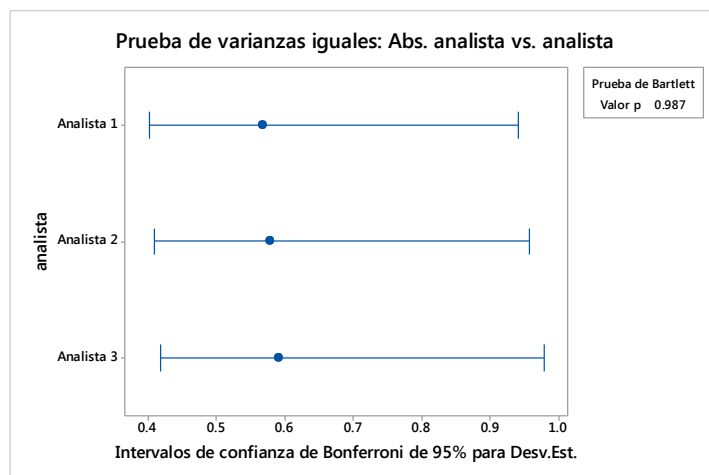
VII. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de regresión: Absorbancia vs. Ácido hipúrico (g/L)

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Regresión	1	5.47792	5.47792	11251.51	0.000
Ác. hipúrico (g/L)	1	5.47792	5.47792	11251.51	0.000
Error	16	0.00779	0.00049		
Falta de ajuste	4	0.00607	0.00152	10.59	0.001
Error puro	12	0.00172	0.00014		
Total	17	5.48571			
Resumen del modelo					
		R-cuad.	R-cuad.		
S	R-cuad.	(ajustado)	(pred)		
0.0220649	99.86%	99.85%	99.81%		

Coeficientes					
Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	VIF
Constante	-0.04354	0.00914	-4.76	0.000	
Ác. hipúrico (g/L)	1.0633	0.0100	106.07	0.000	1.00
Ecuación de regresión: $Y = a + bx$					
Absorbancia = -0.04354 + 1.0633 Ác. hipúrico (g/L)					

Anexo 2. Análisis estadístico de la precisión entre analistas



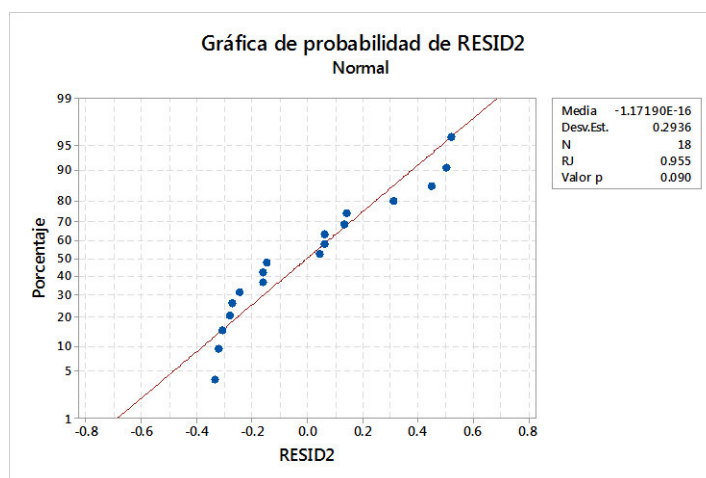
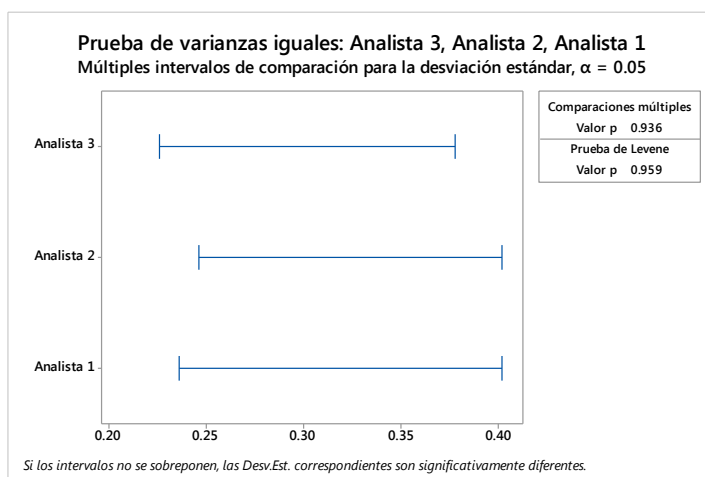
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
analista	2	0.0030	0.001485	0.00	0.996
Error	51	17.1245	0.335775		
Total	53	17.1275			

Medias

analista	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Analista 1	18	0.754	0.568	(0.480, 1.028)
Analista 2	18	0.765	0.579	(0.491, 1.039)
Analista 3	18	0.772	0.591	(0.498, 1.046)

Anexo 3. Análisis estadístico de la determinación de ácido hipúrico en muestras de orina ejecutado por tres analistas



Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0.00088	0.000439	0.01	0.995
Error	51	4.13531	0.081085		
Total	53	4.13619			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Analista 1	18	0.6123	0.2876	(0.4776, 0.7471)
Analista 2	18	0.6191	0.2936	(0.4844, 0.7539)
Analista 3	18	0.6095	0.2727	(0.4748, 0.7442)

Anexo 4. Resultados de absorbancias de muestras de orina

Orina	Analista 1	Analista 2	Analista 3
Muestra 1 (M1)	0.298	0.313	0.307
Muestra 1 (M1)	0.301	0.285	0.311
Muestra 1 (M1)	0.288	0.297	0.3
Muestra 2 (M2)	0.363	0.374	0.368
Muestra 2 (M2)	0.358	0.34	0.372
Muestra 2 (M2)	0.365	0.349	0.373
Muestra 3 (M3)	0.459	0.457	0.457
Muestra 3 (M3)	0.463	0.457	0.448
Muestra 3 (M3)	0.452	0.472	0.45
Muestra 4 (M4)	0.682	0.68	0.681
Muestra 4 (M4)	0.668	0.68	0.68
Muestra 4 (M4)	0.665	0.665	0.693
Muestra 5 (M5)	0.76	0.754	0.78
Muestra 5 (M5)	0.783	0.93	0.784
Muestra 5 (M5)	0.772	0.76	0.762
Muestra 6 (M6)	1.124	1.121	0.984
Muestra 6 (M6)	1.127	1.14	1.118
Muestra 6 (M6)	1.094	1.07	1.103

Anexo 5. Certificado de análisis del ácido hipúrico



Certificate of Analysis

8.20649.0100 Hippuric acid for synthesis
Batch S6857549


	Batch Values	
Assay (acidimetric)	99.3	%
Melting range (lower value)	187	°C
Melting range (upper value)	189	°C
Identity (IR)	passes test	

Date of examination (DD.MM.YYYY) 24.03.2014
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 31.03.2019

Dr. Oliver Schramel
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Anexo 6. Certificado de análisis de piridina (página 1)



Certificate of Analysis

1.09728.0100 Pyridine for analysis EMSURE® ACS Reag. Ph Eur

Batch: **K45236128**

Batch Values		
Purity (GC)	≥ 99.5	%
Identity (IR)	conforms	
Appearance	clear	
Colour	≤ 10	Hazen
Solubility in water	conforms	
Boiling point	114 - 116	°C
Reducing substances	conforms	
Ammonia (NH ₃)	≤ 0.002	%
2-Picoline (GC)	≤ 0.2	%
Piperidine (GC)	≤ 0.01	%
Chloride (Cl)	≤ 0.0005	%
Sulphate (SO ₄)	≤ 0.0005	%
Al (Aluminium)	≤ 0.00005	%
B (Boron)	≤ 0.000002	%
Ba (Barium)	≤ 0.00001	%
Ca (Calcium)	≤ 0.00005	%
Cd (Cadmium)	≤ 0.000005	%
Co (Cobalt)	≤ 0.000002	%
Cr (Chromium)	≤ 0.000002	%
Cu (Copper)	≤ 0.000002	%
Fe (Iron)	≤ 0.00001	%
Mg (Magnesium)	≤ 0.00001	%
Mn (Manganese)	≤ 0.000002	%
Ni (Nickel)	≤ 0.000002	%
Pb (Lead)	≤ 0.00001	%
Sn (Tin)	≤ 0.00001	%
Zn (Zinc)	≤ 0.00001	%
Evaporation residue	≤ 0.002	%
Water	≤ 0.1	%

Date of release (DD.MM.YYYY): 06.01.2014
 Minimum shelf life (DD.MM.YYYY): 31.01.2017

Dr. Michael Savelsberg
 Responsible laboratory manager quality control

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany) +49 6151 72-0
 EMD Millipore Corporation - A division of Merck KGaA, Darmstadt, Germany
 230 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, Phone: (978) 715-4321

Page 1 of 2

Anexo 7. Certificado de análisis de piridina (página 2)


Certificate of Analysis

1.09728.0100 Pyridine for analysis EMSURE® ACS, Reag. Ph Eur

Batch K45236128

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Anexo 8. Certificado de análisis de cloruro de sulfonilbenceno

		
Certificate of Analysis		
8.00470.0100 Benzenesulfonyl chloride for synthesis		
Batch	S6687770	
<hr/>		
Batch Values		
Assay (GC, area%)	100.0	% (a/a)
Density (d 20 °C/ 4 °C)	1.378	
Identity (IR)	passes test	
Date of examination (DD.MM.YYYY) 28.05.2013		
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 31.05.2018		
		Dr. Oliver Schramel Responsible laboratory manager quality control
This document has been produced electronically and is valid without a signature.		
<hr/>		
Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0 EMD Millipore Corporation - A division of Merck KGaA, Darmstadt, Germany 290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, Phone: (978) 715-4321 SALSA 990000022914/(V. 70602 Date: 29.05.2013)		Page 1 of 1